

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

Rec'd PCT/PTO

29 JUL 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年10月16日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/084983 A1

(51) 国際特許分類: C07K 1/04, 1/06, 14/46, 14/465, 9/00

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒530-0003 大阪府
大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル
5階 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04590

(22) 国際出願日: 2003年4月10日 (10.04.2003)

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, IL, KR, US.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-109761 2002年4月11日 (11.04.2002) JP

規則4.17に規定する申立て:

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一
サントリーファーマ株式会社 (DAIICHI SUNTORY
PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒102-8530 東京都千
代田区麹町五丁目7番地2 Tokyo (JP). 寒川 賢治
(KANGAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府箕面市
小野原東6丁目28、4-201号 Osaka (JP).— AU, BR, CA, CN, IL, KR, ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
— すべての指定国のための先の出願に基づく優先権を主張する出願人の資格に関する申立て (規則4.17(iii))
— USのみのための発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南竹 義春 (MI-
NAMITAKE, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒370-0311 群馬県新
田郡新田町瑞樹34-3 Gunma (JP). 松本 大 (MAT-
SUMOTO, Masaru) [JP/JP]; 〒374-0076 群馬県館林市
日向町1000-5-A203 Gunma (JP). 牧野 智宏
(MAKINO, Tomohiro) [JP/JP]; 〒374-0016 群馬県館林
市松原1丁目14-3 Gunma (JP).— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING MODIFIED PEPTIDE

(54) 発明の名称: 修飾ペプチドの製造方法

(57) Abstract: A process for producing a peptide or a protein containing an amino acid residue having a modified side chain characterized by comprising chemically producing a peptide fragment containing an amino acid residue having a modified side chain with the use of a weakly acidic eliminating resin, producing by a genetic modification method and/or an enzymatic method another peptide fragment containing no amino acid residue having a modified side chain, and then fusing the obtained two peptides fragments with each other. According to this process, a peptide or a protein having a modification such as acylation, glycosylation or phosphorylation and being excellent in qualities can be efficiently obtained.

(57) 要約: 本発明は、側鎖が修飾されたアミノ酸残基を含むペプチド断片を弱酸性離脱樹脂を用いて化学的に製造し、側鎖が修飾されたアミノ酸残基を含まないペプチド断片を遺伝子組換え法又は/及び酵素法を用いて製造し、ついで得られた2種のペプチド断片を縮合することを特徴とする側鎖が修飾されたアミノ酸残基を含むペプチド又は蛋白質を製造する方法であって、本発明によれば、アシル化、糖化、リン酸化等の修飾を含むペプチド又は蛋白質を効率的かつ高品質で得ることができる。

WO 03/084983 A1

RECEIVED

RECEIVED

THIS PAGE BLANK (USPTO)

修飾ペプチドの製造方法

5 技術分野

本発明は、修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、及び前記製造方法に好適に用いられる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片の製造方法に関する。

10 背景技術

オーファンレセプターの一つである成長ホルモン分泌促進因子レセプター（GHS-R）に対する内因性成長ホルモン分泌促進因子（GHS）が1999年ラット胃から精製単離され、グレリンと命名された（Kojima ら、Nature, 402 巻, p. 656-660、1999 年）。本ペプチドは、セリン残基の水酸基が脂肪酸でアシル化された特徴的な構造を有することで知られる。さらにラット以外の脊椎動物、例えばヒト、マウス、ブタ、ニワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマス又はイヌからも3位のセリン残基又はスレオニン残基が脂肪酸修飾部位を有するグレリンが単離、あるいはcDNAから推定された（第1表）。例えばヒトグレリンはアミノ酸28個からなり、3位のセリン側鎖が脂肪酸（n-オクタン酸）でアシル化されている。この新規ペプチドは強力な成長ホルモン分泌促進活性を有し、3位セリン又はスレオニンの脂肪酸修飾はその活性発現に必須であることが分かっている（Kojima ら、Nature, 402 巻, p. 656-660、1999 年）。また、胃から分泌されたグレリンは、血中ホルモンとして成長ホルモン分泌の調節に機能することが解明され、グレリンの生理的役割と医薬品への適用に関して興味をもたれている。

第1表

	ヒト	(Human)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
5	ラット	(Rat)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
	マウス	(Mouse)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKVQQRKESKKPPAAKLKPR
	ブタ	(Porcine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEAKKPSGRLKPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
	ウシ	(Bovine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
10	ヒツジ	(Ovine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
	イヌ	(Canine)	: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPEHQKLQRKEPKKPSGRLKPR
	ウナギ	(Eel)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH ₂
			: GSS (n-octanoyl) FLSPSQRPQGKDKKPPRV-NH ₂
	ニジマス	(Trout)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQVRQGGKPPRV-NH ₂
			: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQGGKPPRV-NH ₂
15	ニワトリ	(Chicken)	: GSS (n-octanoyl) FLSPQKNIQQQKTRKPTAR
			: GSS (n-octanoyl) FLSPQKNIQQQKTRKPTAR
	ウシガエル	(Bullfrog)	: GSS (n-octanoyl) FLSPQKNIQQQKTRKPTARLH
			: GSS (n-octanoyl) FLSPQKNIQQQKTRKPTARLH
	ウシガエル	(Bullfrog)	: GLT (n-octanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
			: GLT (n-decanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
	ウシガエル	(Bullfrog)	: GLT (n-octanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
			: GLT (n-octanoyl) FLSPADMQKIAERQSQNKL RHGNM
20	テラピア	(Tilapia)	: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH ₂
			: GSS (n-octanoyl) FLSPSQKPQNKVKSSRI-NH ₂
	ナマズ	(Catfish)	: GSS (n-octanoyl) FLSPQKQNRGDRKPPRV-NH ₂
			: GSS (n-octanoyl) FLSPQKQNRGDRKPPRVG
	ウマ	(Equine)	: GSS (n-butanoyl) FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR
			: GSS (n-butanoyl) FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR
25			: GSS (n-butanoyl) FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR
			: GSS (n-butanoyl) FLSPEHHKVQHRKESKKPPAKLKPR

オクタノイル基(C8)以外にも、ブタノイル基(C4)、ヘキサノイル基(C6)、デカノイル基(C10)、ドデカノイル基(C12)修飾体が存在する。また、不飽和脂肪酸による修飾体も存在する。

グレリンやコレシストキニンのように、ペプチド又は蛋白質の中には、アミノ酸配列中のある特異的なアミノ酸残基がアシル化やスルホン化、糖付加又はリン酸化等の修飾を受けることにより、その生理学的役割を発現するものがある。これらの修飾は生体内における精緻な酵素系により施されることが考えられており、修飾を有するペプチド又は蛋白質を、高品質かつ効率的に大量に製造する一般的な方法はこれまで報告されていない。たとえば、グレリンは長鎖脂肪酸により特定のアミノ酸側鎖が修飾を受けることで成長ホルモン分泌促進作用を示すことから、脂肪酸修飾は必須の構造的要素であるが、生体がどのような酵素系を駆使して、脂肪酸を特定のアミノ酸側鎖の水酸基上にエステル結合させるのか、あるいは脂肪酸が伸長していくのか現時点では明らかにされていない。特にグレリンは、アミノ酸側鎖の水酸基が脂肪酸で修飾された構造を有することが初めて明らかにされた生理活性ペプチドであるために、本ペプチドが摂食障害治療薬、成長ホルモン分泌促進薬等の医薬品として期待される有用なペプチド性ホルモンであるにもかかわらず、特定の水酸基含有アミノ酸側鎖に脂肪酸修飾を有するペプチドの製造は一般化されていない、即ち、大量に製造するのに有利な工業的製造方法が確立されていないのが現状である。

現在、インスリン、成長ホルモン、カルシトニン、心房性ナトリウム利尿ペプチド、LH-RH誘導体、副腎皮質刺激ホルモン誘導体など種々のペプチド又は蛋白質製剤が医薬品として使用されている。これらのペプチド又は蛋白質の製造方法としては、化学合成法、酵素法、遺伝子組換え法による製造方法が知られている。いずれの方法を選ぶかは適宜選択されるが、一般的に残基数が少ない場合には化学合成法が、残基数が多い場合は酵素法もしくは遺伝子組換え法が選択される。

例えば、化学合成法は最も確実にグレリン等の修飾をもつ生理活性ペプチド又は蛋白質を製造できる方法である。修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法

として、化学合成法による製造方法はすでに数多く報告されている。グレリンの例では、Bednarek ら (J. Med. Chem., 43 巻、p.4370-4376, 2000 年)、Matsumoto ら (Biochem. Biophys. Res. Commun., 284 巻、p.655-659, 2001 年) により報告されている。また、国際公開番号: WO 01/07475 に、グレリン及びグレリン誘導体であるペプチド又はその塩の製造方法として、化学合成法による方法が記載されている。しかし、化学合成法による製造方法においては、一定の品質（純度）を保って合成できるペプチドの鎖長に通常制限がある。液相化学合成法は高純度のペプチドを合成することが可能であるが、長鎖ペプチドの合成には、溶解度、長い製造工程、反応処理に要する特別の技術等の点で一般的でない。即ち、効率的に大量に製造することは、液相化学合成法を用いる製造方法では難しい。一方、樹脂上でペプチド鎖を延長する固相化学合成は、工程が単純化されており、大量生産にはより有利であるが、本法も一定品質の目的物を得るにはおのずと構築可能な鎖長に制限がある。加えて、試薬を過剰に用いるために、特に長鎖ペプチドの製造において経済性で劣るという問題もある。

また、酵素法のようにペプチド断片を酵素的に結合させていく方法は、アミノ酸側鎖の保護を最小に出来る点で優れているが、本法においては、通常加水分解の逆反応を用いるために、原理的に条件の設定が難しく実用的ではない。

一方、遺伝子組換え法による生理活性ペプチド又は蛋白質の製造は、大量生産に適した有用な製造方法である。しかしながら、生産性の高い大腸菌等の原核生物を用いる方法は、原核生物が翻訳後修飾の系をもたないため、修飾部位をもつペプチドの直接的な製造は難しい。酵母や各種卵細胞のような真核細胞を用いる遺伝子組換え法においては、糖修飾、アシル化、スルホン化、リン酸化等の修飾は可能であるが、例えば脂肪酸に関して、一定長の脂肪酸のみを導入することは難しい。単離されたグレリンのなかには、オクタン酸

(C 8) だけではなく、ブタン酸 (C 4)、デカン酸 (C 10)、あるいはこれらの不飽和脂肪酸を有するものが発見されていることから、特定鎖長の脂肪酸の導入を制御することの困難さは明らかである。加えて、真核細胞による生産性は一般的に低いことから、修飾の系を有する酵母や各種卵細胞
5 の生産系はグレリン等の修飾を受けたペプチド又は蛋白質の大量生産という観点からは、多くの改良の余地がある。

以上述べてきたように、修飾ペプチド又は蛋白質を合成する方法として化学合成法があり、すでに種々の報告がなされているが、大量に製造するためには、収率、コストの点において改良の余地がある。大腸菌等の原核細胞を用いた遺伝子組換え法で直接的に翻訳修飾を受けたペプチド又は蛋白質を製造
10 するのは難しい。また、酵母等の真核細胞を用いた遺伝子組換え法による製造も、単一性又は生産性の点で問題があり、これを克服するために改良の余地がある。加水分解反応の逆反応を使う酵素法は、各々の縮合条件の設定が困難であり、大量生産に有利な方法であるとはいえない。

15 このように、従来知られている、化学合成法、酵素法、遺伝子組換え法を単独で適用して、糖修飾、アシル化、スルホン化、リン酸化等の修飾を有するペプチド又は蛋白質を、品質と量的な要素を満足させ、かつ効率よく製造することについては、更なる改良の余地があった。

20 そこで、上記方法の長所を生かし、欠点を補う方法の一つに、化学合成法と遺伝子組換え法を組み合わせた半合成法が挙げられる。本製造方法の重要な点は、縮合に適した形態のペプチド断片を効率よく製造することである。修飾されたアミノ酸残基を有するペプチド断片（以下、修飾成分ともいう。）及び修飾されたアミノ酸残基を有さないペプチド断片（以下、非修飾成分とも
25 いう。）は、N末端側又はC末端側の何れであっても良く、また、修飾成分が複数であっても良い。適宜、目的とするペプチド又は蛋白質に合わせて、製

造方法を設計することができる。一例として、修飾成分がN末端側に存在し、当該ペプチド断片（修飾成分）と縮合される他方のペプチド断片が非修飾成分である場合について詳細に言及する。

近年注目されている、Native chemical ligation 法（Dawson ら、Science, 266 巻、p. 776-779、1994 年）は、Ligation 部位に Cys 残基が残る欠点があったが、最近、本方法を改良したチオエステル法が提案された。例えば、Kawakami らにより、チオエステルを用いた方法でリン酸化ペプチドの合成が報告されている（Tetrahedron Letter, 41 巻、p. 2625-2628、2000 年）。

前記チオエステル法の実例を以下に示す。リン酸化された p21Max 蛋白質の合成例において（Kawakami ら、Tetrahedron Lett., 39 巻、p. 7901-7904、1998 年）、固相化学合成法でリン酸修飾部位を含むペプチド断片（修飾成分）（13 mer）をチオエステルとして製造する。一方、非修飾成分のN末端に一アミノ酸残基を付加させた配列を有するペプチド断片を大腸菌で製造し、このものに2価銅又はニッケルイオン存在下で、グリオキシル酸を作用させ、N末端に付加したアミノ酸残基を α ケトアシル基に変換したのち、側鎖アミノ基をBoc基で保護する。次に、フェニレンジアミンで α ケトアシル基を除去することで、N末端アミノ酸残基のアミノ基のみが遊離したペプチド断片（非修飾成分）を調製している。最後にこれらの両断片を銀塩、過剰の HOBt 等の活性エステル化剤を加え縮合している。

上記方法においても、まだ下記のような課題が残る。ペプチド断片（修飾成分）の製造において、そのチオエステルの安定性上の課題があり、収率は11%と記載されている。また、ペプチド断片（非修飾成分）の製造において、 α ケトアシル基を用いる本方法はN末端アミノ基を遊離させる化学的方法として選択性が高いが、 α ケトアシル基が不安定であること、及び本基の脱離にフェニレンジアミン等の変異原性物質を使用する点で、医薬品用の生理活性ペプチド又は蛋白質の製造の場合、安全性の課題が残る。また、両断

片の縮合反応において、銀塩、過剰の HOOBt 等の活性エステル化剤を使用しており、ラセミ化、毒性、コストの点でも課題がある。

化学合成法と遺伝子組換え法を組み合わせた半合成法は、国際公開番号：W0 01/07475 にも、グレリン及びグレリン誘導体であるペプチド又はその塩の製造方法として記載されている。より具体的には、化学合成法により調製した
5 ラットグレリン(1-5)と遺伝子組換え法により調製したラットグレリン(6-28)を縮合してラットグレリン(1-28)を調製する方法が記載されている。しかし、かかる方法においてもまた下記のような課題を有することから、効率のよい工業的製造に有利な製造方法とするには、多くの改良の余地がある。即ち、
10 TFA によりペプチド鎖を樹脂から離脱させてラットグレリン(1-5)を得る際に、同時に Boc 基、t-Bu 基が除去されるため、再度 Boc 基をN末端に導入する必要があること、また、Ser 側鎖が無保護になるために、ラットグレリン(6-28)との縮合に、強い活性化剤を使用できない等の点において、生産性を向上させる余地がある。また、保護ラットグレリン(1-5)及び保護ラットグレ
15 リン(6-28)を縮合する過程において、アシルペプチド断片部のC末端アミノ酸がラセミ化しうるため、これを抑制するために改良の余地があった。なお、グレリン(m-n)は、グレリンのN末端からm番目～n番目のアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。以下も同様である。

また、保護ペプチド断片(非修飾成分)を調製する際にもいくつかの課題
20 がある。国際公開番号：W0 01/07475 に記載された保護ラットグレリン(6-28)の製法は、基本的には2段階酵素処理法(国際公開番号 W099/38984)を採用しており、そのプロセッシング酵素として組換え V8 プロテアーゼ誘導体(rV8D5)(特開平 9-47291)と Kex2 プロテアーゼ(特開平 10-229884)の2種類の酵素を使用している。しかしながら保護ラットグレリン(6-28)を含む
25 融合たんぱく質を発現するプラスミド(pG97s rGR)は大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体とヒト副甲状腺ホルモン(1-34)との融合蛋白質を高発現するプ

ラスミド（特開平 9-296000）を元に構築したもののなので、保護ペプチド断片（非修飾成分）を調製する際には、そのアミノ酸配列に適したリンカー配列を選択する必要がある場合がある。

さらに、保護ラットグレリン(6-28)は水溶液中で保護基が離脱するという現象があり、精製における回収率は10%と非常に低くグレリンを大量に安定供給するという側面においてなお課題を有する。

以上、化学合成法と遺伝子組換え法の組み合わせによっても、効率がよく、かつ得られた製品を医薬品として使用できるような安全性の高い、修飾された生理活性ペプチド又は蛋白質の製造方法の実現には更なる課題がある。

10

発明の開示

本発明は、修飾をうけたペプチド又は蛋白質の簡便で効率のよい工業的製造方法を提供することを目的とするものである。具体的には、本発明は、修飾部位を含むペプチド断片（修飾成分）を化学合成法により製造し、修飾部位を含まないペプチド断片（非修飾成分）を遺伝子組換え法により製造し、両者を縮合することで効率よく高品質の修飾をうけた生理活性ペプチド又は蛋白質を製造する方法を提供することを目的とするものである。前述したように、これらの各ペプチド断片（修飾成分及び非修飾成分）は、N末端側断片又はC末端側断片の何れであっても良く、また、修飾成分が複数であっても良い。適宜、目的とするペプチド又は蛋白質に合わせて、製造方法を設計することができる。また、本発明は、縮合反応に適した、保護されているペプチド断片（修飾成分）を修飾部位の構造に影響を与えない温和な条件で製造する方法、及び保護されているペプチド断片（非修飾成分）との縮合に適した保護されているペプチド断片（修飾成分）の製造方法を提供することを目的とするものである。さらに、本発明は、得られた製品を医薬品として使用できるような安全性の高い、修飾された生理活性ペプチド又は蛋白質の製造

25

方法を提供することを目的とするものである。特に本発明は、グレリン及びグレリン誘導体の簡便で効率のよい工業的製造方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、グレリンを素材に、グレリン又はその誘導体の中のアシル基により修飾されたアミノ酸を含むペプチド断片（修飾成分）の合成方法の改良を行い、ペプチド断片（修飾成分）の製造工程を大幅に簡略化かつ効率化しうる方法確立した。即ち、2-クロロトリチル樹脂等の弱酸性離脱樹脂上でペプチド断片（修飾成分）のペプチド主鎖配列を構築し、引き続き、残基選択的修飾を施した後、酢酸等の弱酸処理により固相樹脂上から保護修飾ペプチドを切り出すことができることを見出した。従来の技術として、トリフルオロ酢酸等で樹脂から切り出せるWang樹脂等の樹脂上で修飾基を導入した後、樹脂からの切り出しとともに保護基も脱離させる方法が知られていた。しかし、本法においては、切り出したペプチド断片（修飾成分）は、引き続き、もう一方のペプチド断片（非修飾成分）との縮合反応に供するため、樹脂からの切り出しとともに保護基も脱離されてしまう従来技術による方法は、再び保護基を導入しなければならないため、簡便で効率的な製造という観点からは好ましくない。そこで、本発明者らは、ペプチド断片（修飾成分）の樹脂からの切り出しには、アミノ酸側鎖の保護基を脱離させにくい弱酸（希釈された強酸を含む）を用い、一方で、ペプチドが樹脂から離脱せずに、樹脂上で特定のアミノ酸側鎖の保護基を脱離させて残基選択的修飾を施す方法として、フッ化四級アンモニウムを用いる方法が有効であることを鋭意検討の結果、見出した。従来、フッ化四級アンモニウムのなかでも、テトラブチルアンモニウムフロオリド（TBAF）は固相樹脂からペプチドを離脱させる試薬として用いられていた（J. Chem. Soc., Chem. Commun., p. 414-415, 1988 年、Tetrahedron Letters, 34 巻, p. 7599-7602, 1993 年）が、本発明者らは弱酸性離脱樹脂上に構築したペプチドはTBAF処理によって樹脂から離脱しないこ

とを見出した。この結果、TBAFを用いれば、ペプチドが樹脂から離脱することなく、そのゆえに、樹脂上で特定のアミノ酸側鎖の保護基を脱離させて残基選択的修飾を施すことができ、ついで、アミノ酸側鎖の保護基を脱離させにくい弱酸（希釈された強酸を含む）を用いペプチド断片（修飾成分）

- 5 を樹脂から切り出すことにより、次工程のペプチド断片（非修飾成分）との縮合反応の際に、事前にペプチド断片（修飾成分）を保護する工程が必要なくなり、修飾をうけた生理活性ペプチド又は蛋白質の製造工程を大幅に簡略化かつ効率化することができた。

- さらに本発明者らは、グレリンの保護ペプチド断片（非修飾成分）の調製
10 方法を改良し、保護グレリン（8－28）断片を2段階酵素処理法で大量に調製するために最適ナリンカー配列を見出した。さらに本発明者らは、保護基が離脱しないpH条件で精製することで保護ペプチド断片（非修飾成分）の製造工程を大幅に簡略化かつ効率化しうる方法を確認した。すなわち、保護ペプチドの調製時に保護基が離脱する現象は水溶液のpH及び温度に依存し
15 ており、水溶液のpHを4－8とすることにより保護基の離脱が阻止でき、収率よく保護ペプチド（非修飾成分）を調製できることを見出した。

- また、各ペプチド断片の縮合方法を改良し、アミノ酸の活性化時、及び縮合時のラセミ化を抑制し、グレリン又はグレリン誘導体をより高品質かつ高収率で得ることができる製造方法を見出した。特に、弱酸性離脱樹脂を用いたグレリンの製造方法は、副反応により生じるジケトピペラジンの形成を抑制
20 することができるという利点がある。即ち、C末端アミノ酸残基が7位のプロリンであるので、ジペプチド（-Ser-Pro-）に3個目のアミノ酸（Leu）を縮合する時に、ジケトピペラジンを巻いて樹脂から離脱する副反応を最小限に抑えることができる。

- 25 この知見に基づき、さらに、アルキル基はいうまでもなく、アシル基、リン酸基又は硫酸基を、グリコシド結合、ジスルフィド結合、エーテル結合、

チオエーテル結合又はアミド結合等を介してアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖に結合した種々の修飾構造を有する生理活性ペプチド又は蛋白質の製造にも容易に適用できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、

- 5 (1) 弱酸性離脱樹脂を用いることを特徴とする、式1； $-A(R)-$ （式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している置換基を示す、）で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片の製造方法、

- 10 (2) (a) 弱酸性離脱樹脂上に、側鎖が保護されているアミノ酸又は／及び非アミノ酸の所望の配列を有するペプチド断片を作製し、(b) 前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上から脱離させることなく、置換基Rにより修飾をうけるアミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖の保護基を脱保護し、(c) 前記脱保護した側鎖を置換基Rで修飾し、(d) 弱酸性離脱樹脂からペプチド断片を切り出すことを特徴とする前記(1)に記載のペプチド断片の製造方法、

- 15 (3) アミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖の保護基が、シリル系保護基であり、前記保護基の脱保護にフッ化四級アンモニウムを用いることを特徴とする前記(1)又は(2)に記載のペプチド断片の製造方法、

- 20 (4) シリル系保護基が、*t*-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、*t*-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリイソプロピルシリル (TIPS)、トリイソブチルシリル (TIBS)、*t*-ヘキシルジメチルシリル (ThxDMS) 又はトリフェニルシリル (TPS) であり、フッ化四級アンモニウムがテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF)、テトラエチルアンモニウムフルオリド (TEF) 又はアンモニウムフルオリドであることを特徴とする前記(3)に記載のペプチド断片の製造方法、

- 25 (5) Aがセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-ア

ミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン又はアスパラギンであり、Rがエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合等を介してAの側鎖に結合していることを特徴とする前記(1)～(4)に記載のペプチド断片の製造方法、

(6) Aがセリン又はスレオニンであり、Rがエステル結合を介してAの側鎖に結合していることを特徴とする前記(5)に記載のペプチド断片の製造方法、

(7) ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体、又は前記グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸を含む部分であることを特徴とする前記(6)に記載のペプチド断片の製造方法、

(8) (a) 式1; $-A(R)-$ (式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している置換基を示す、) で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片を、
弱酸性離脱樹脂を用いて製造し、前記(a)のペプチド断片とは別個に、(b) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造し、前記(a)及び(b)で製造されたペプチド断片を縮合することを特徴とする修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(9) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片を、前記(2)～(4)に記載の方法で製造することを特徴とする前記(8)に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(10) Aがセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-アミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン又はアスパラギンであり、Rがエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合によりAの側鎖に結

合していることを特徴とする前記（８）又は（９）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１１） Ａがセリン又はスレオニンであり、Ｒがエステル結合を介してＡの側鎖に結合していることを特徴とする前記（１０）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１２） 修飾ペプチド又は蛋白質が、グレリン又はその誘導体であることを特徴とする前記（１１）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１３） ペプチド断片の縮合が、縮合剤を用いて行われることを特徴とする前記（８）～（１２）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１４） 縮合剤が、２－（１－ヒドロベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート（HBTU）、２－（１－ヒドロベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート（TBTU）、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）、ジフェニルホスホロシアニデート（DEPC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）又は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）であることを特徴とする前記（１３）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１５） 縮合剤が、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）又は１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）であり、前記縮合剤を用いるペプチド断片の縮合が、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、１－ヒドロキシスクシンイミド（HOSu）又は３，４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－ベンゾトリアジン（HOOBt）の存在下、行われることを特徴とする前記（１３）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

に関する。

より具体的に、本発明は、修飾をうけたペプチド又は蛋白質を断片縮合に

より製造する過程において、(a) 修飾基を含むペプチド断片を製造するとき、2-クロロトリチル樹脂等の弱酸性離脱樹脂を用いて合成することを特徴とする、修飾をうけた生理活性ペプチド又は蛋白質の製造方法、(b) 酸で脱離しやすいアシル基、硫酸基等を含むペプチド断片を合成する際、2-クロロトリチル樹脂等の弱酸性離脱樹脂を用いて製造することを特徴とする、修飾を有する生理活性ペプチド又は蛋白質、特にグレリン又はグレリン誘導体の製造方法、(c) 修飾を含むペプチド断片（修飾成分）と修飾を含まないペプチド断片（非修飾成分）との縮合を行うとき、活性化させるN末端側断片のC末端残基にプロリンを介することにより、構成アミノ酸のラセミ化を抑制したことを特徴とするグレリン又はグレリン誘導体の製造方法、(d) グレリン又はグレリン誘導体の製造に顕著に良好であった縮合剤に関する。

更に、本発明は、

- (1) アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有し、そのうち少なくとも1のアミノ酸又は非アミノ酸が式1； $-A(R)-$ （式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している修飾のために導入された置換基を示す。）で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸であり、かつアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基が保護基により保護されているペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上で作製し、ついで、弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させることなく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱することを特徴とする、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片の製造方法、
- (2) (a) アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有し、かつアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジ

ノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基が保護基により保護されているペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上で作製し、(b) 前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上から離脱させることなく、置換基Rにより修飾をうけるアミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖における反応性官能基に保護基が導入されている場合は、当該保護基を脱保護し、(c) 前記脱保護した側鎖を置換基Rで修飾し、(d) 弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させることなく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させることを特徴とする前記

5

10 (1) に記載のペプチド断片の製造方法、

(3) (a) 弱酸性離脱樹脂上で、アミノ酸又は／及び非アミノ酸の所望の配列を有し、かつアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の反応性置換基が保護基により保護されているペプチド断片を作製し、ついで、(b) 弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させることなく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させ、(c) 離脱させたペプチド断片の少なくとも1のアミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖における反応性置換基の保護基を脱保護し、(d) 前記脱保護した側鎖を置換基Rで修飾することを特徴とする式1 ; $-A(R)-$

15

20 (式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している置換基を示す。) で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片の製造方法、

(4) 置換基Rにより修飾を受けるアミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖における反応性置換基の保護基が、シリル系保護基であり、前記保護基の脱保護にフッ化四級アンモニウムを用いることからなる前記(2)又は(3)に記載のペプチド断片の製造方法、

25

(5) シリル系保護基が、*t*-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、*t*-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリイソプロピルシリル (TIPS)、トリイソブチルシリル (TIBS)、*t*-ヘキシルジメチルシリル (ThxTMS) 又はトリフェニルシリル (TPS) であり、フッ化四級アンモニウムがテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF)、テトラエチルアンモニウムフルオリド (TEF) 又はアンモニウムフルオリドである前記 (4) に記載のペプチド断片の製造方法、

(6) Aがセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-アミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン又はアスパラギンであり、Rがエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合を介してAの側鎖の反応性官能基に結合していることからなる前記 (1) ~ (5) に記載のペプチド断片の製造方法、

(7) Aがセリン又はスレオニンであり、Rがエステル結合を介してAの側鎖の水酸基に結合していることからなる前記 (6) に記載のペプチド断片の製造方法、

(8) ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体、又は前記グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸を含むペプチド断片である前記 (7) に記載のペプチド断片の製造方法、

(9) (a) 前記 (1) ~ (8) に記載の方法によって修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片を製造し、前記 (a) のペプチド断片とは別個に、(b) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まず、かつ、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、望ましくない副反

応を惹起する可能性を有する反応性官能基が保護されているペプチド断片を製造し、前記 (a) 及び (b) で製造されたペプチド断片を縮合することを特徴とする修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(10) ペプチド断片の縮合が、縮合剤を用いて行われることからなる
5 前記 (9) に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(11) 縮合剤が、2-(1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル)-
1, 1, 3, 3-тетрамethyluronium hexafluorophosphate
(HBTU)、2-(1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3,
3-тетрамethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)、ジフェニル
10 ホスホリルアジド (DPPA)、ジフェニルホスホロシアニデート (DEPC)、ジイ
ソプロピルカルボジイミド (DIPC)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)
又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC)
である前記 (10) に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(12) 縮合剤が、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC)、ジシクロヘ
15 キシルカルボジイミド (DCC) 又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロ
ピル)カルボジイミド (EDC) であり、前記縮合剤を用いるペプチド断片 (a)
と (b) の縮合が、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、1-ヒドロ
キシスクシンイミド (HOSu) 又は3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-
オキソ-ベンゾトリアジン (HOOBt) の存在下で行われることからなる前記 (1
20 0) に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(13) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されてい
るペプチド断片を、酵素法又は/及び遺伝子組換え法により製造することから
なる前記 (9) ~ (12) に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

(14) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されてい
25 るペプチド断片を、下記方法；

工程 (1)；前記ペプチド断片のアミノ酸配列を有するペプチド (以下、本項

において目的ペプチドという。)をコードする塩基配列又は目的ペプチドに所望によりリンカー配列を介して保護ペプチドが付加されている融合蛋白質をコードする塩基配列のいずれかを有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取す

5 工程；

工程（２）；工程（１）において融合蛋白質を採取した場合、得られた融合蛋白質から、保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとを切断分離し、所望により目的ペプチドをさらに精製する工程；

10 工程（３）；工程（１）又は（２）で得られた目的ペプチドの側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる１種以上の、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基を保護基により保護する工程；

15 を含む方法により製造することからなる前記（１３）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１５） 工程（２）における保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとの切断分離が、Omp Tプロテアーゼ又はその誘導体及びKex 2プロテアーゼ又はその誘導体を用いて２段階で行われることからなる前記（１４）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

20 （１６） リンカー配列が、配列番号２７に記載の配列である前記（１４）又は（１５）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１７） ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ基を含まないペプチド断片であることを特徴とする前記（１３）～（１６）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

25 （１８） 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を、pH 4～8の溶液中で精製及び保存することを特徴とす

る前記（１３）～（１７）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（１９） 保護基がBoc基である前記（１３）～（１８）に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、

（２０） 工程（１）；所望のアミノ酸配列を有するペプチド（以下、本項
5 において目的ペプチドという。）をコードする塩基配列又は目的ペプチドに所望によりリンカー配列を介して保護ペプチドが付加されている融合蛋白質をコードする塩基配列のいずれかを有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取する工程；

10 工程（２）；工程（１）において融合蛋白質を採取した場合、得られた融合蛋白質から、保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；

工程（３）；工程（１）又は（２）で得られた目的ペプチドの側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカ
15 プト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる１種以上の、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基を保護基により保護する工程；

工程（４）；工程（３）で得られた保護されている目的ペプチドを、pH 4～8の溶液中で精製及び保存する工程；

20 を含む方法により製造することを特徴とする修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法、

（２１） 保護基がBoc基である前記（２０）に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法、

25 （２２） 工程（２）における保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとの切断分離が、Omp Tプロテアーゼ又はその誘導体及び

Kex2 プロテアーゼ又はその誘導体を用いて2段階で行われることからなる前記(20)または(21)に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法、

(23) リンカー配列が、配列番号27に記載の配列である前記(20) ~ (22)に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法、

(24) ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ基を含まないペプチド断片であることを特徴とする前記(20) ~ (23)に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法、
10 に関する。

図面の簡単な説明

第1図Aは、hGhrelin(8-28)の全合成オリゴ DNA ならびにアミノ酸配列を表している。第1図Bは、p117 8-28oRR により発現される hGhrelin(8-28)融合蛋白質のアミノ酸配列を示している。
15

第2図は、精製した $[Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28)$ の HPLC 分析結果を示している。ピーク A)は、 $[Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28)$ のピークを示す。

第3図は、断片の縮合反応を示している。ピーク Aは $[N^{\alpha}-Boc, Ser^{2,6}(tBu)]hGhrelin(1-7)$ のピークを、ピーク Bは $[Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28)$ のピークを、ピーク Cは $[N^{\alpha}-Boc, Ser^{2,6}(tBu), Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin$ のピークを、ピーク Dは hGhrelin のピークを示す。
20

第4図は、精製した hGhrelin の HPLC 測定結果を示している。

第5図は、Kex2 プロテアーゼの切断認識部位が異なる融合蛋白質のアミノ酸配列を示している。

第6図は、第5図で作成した各融合蛋白質のKex2切断効率をHPLCで分析した結果を示している。第6図Aは、PR-hGhrelin(8-28)のKex2酵素反応後の
25

HPLC分析結果を示す。第6図Bは、RR-hGhrelin(8-28)のKex 2酵素反応後のHPLC分析結果を示す。第6図Cは、KR-hGhrelin(8-28)のKex 2酵素反応後のHPLC分析結果を示す。ピークア)は、リンカー配列を含む
[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)のピークを示す。ピークイ)は、
5 [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)のピークを示す。ピークウ)は、
[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(16-28)のピークを示す。

第7図は、培養に最適な融合蛋白質を決定するために作成した各hGhrelin(8-28)融合蛋白質のアミノ酸配列を示している。

第8図Aは、融合蛋白質の違いによる培養結果の差を示し、第8図Bは各
10 融合蛋白質での培養液の菌体破碎前の濁度に対する菌体破碎後の濁度（融合蛋白質による相違）を示している。

第9図は、[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)の安定性評価結果を示している。

第10図は、[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)の安定性評価結果を示して
15 いる。

発明を実施するための最良の形態

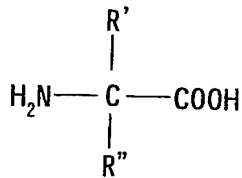
本発明を説明するに際し、下記用語を以下のように定義する。

「アミノ酸」とは、同一分子内にアミノ基とカルボキシル基を有する化合物であり、例えば、L-アミノ酸、D-アミノ酸、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸等あらゆるアミノ酸を含む。

「天然アミノ酸」とは、遺伝子によりコードされる20種類のアミノ酸をいう。

25 「非天然アミノ酸」とは、 α -アミノ酸における α 炭素が天然アミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない任意の置換基で修飾されている

化合物をいう。即ち、 α -アミノ酸を下記式；



で表したとき、 R' 、 R'' で示される置換基として、天然アミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない任意の置換基又は水素原子（但し、 R'

- 5 及び R'' がともに水素原子である場合を除く。）を有する化合物が挙げられる。

「非アミノ酸」とは、C、H、O、N及びSからなる群から選ばれる1種以上の原子からなるアミノ酸の類似体であって、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸に含まれない化合物をいう。なかでも、分子鎖長がペプチド相当長又はジペプチド相当長の化合物が好ましい。例えば、 $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$ 、
 10 $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-COOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$ （何れも分子鎖長がペプチド相当長）、又は $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_4\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_2\text{-(CH}_2)_3\text{-COOH}$ 、
 $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_3$ 、 $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_3$ （何れも分子鎖長がジペプチド相当長）等が本発明でいう「非アミノ酸」に含まれる。ここで、 R_{11} は、天然アミノ酸の側鎖を表す。ペプチドにおける

- 15 「非アミノ酸残基」としては、例えば、 $\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CO-}$ 、
 $\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_2\text{-}$ （何れも分子鎖長がペプチド相当長）、又は
 $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CO-}$ 、 $\text{-NH-(CH}_2)_4\text{-CO-}$ 、 $\text{-NH-C}(\text{CH}_3)_2\text{-(CH}_2)_3\text{-CO-}$ 、
 $\text{-NH-CH}(\text{CH}_3)\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO-}$ 、 $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}$ 、
 $\text{-NH-(CH}_2)_3\text{CH}(\text{R}_{11})\text{-CH}_2\text{-}$ （何れも分子鎖長がジペプチド相当長）等が挙げられ、
 20 隣接するアミノ酸との結合はペプチド結合でない場合がありえる。

「ペプチド」又は「ペプチド断片」とは、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なった化合物のことをいう。ここで、非アミノ酸を含む場合は、当該非アミノ酸と隣接するアミノ酸との結合はペプチド結合ではない場合があるが、

この場合の化合物もペプチド又はペプチド断片と総称する。

「保護されているペプチド断片」とは、ペプチド断片のアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して又はペプチド断片の縮合反応に際して、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基が保護基によって保護されているペプチドの断片をいう。以下、本明細書においては、「保護ペプチド断片」と略称する。

「修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸」は、式1； $-A(R)-$ （式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している修飾のために導入された置換基を示す。）で表わされる。

上記置換基Rは、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基又はカルボキシル基から水素原子を除去して形成される基に結合している場合もあるし、アミノ酸又は非アミノ酸の α 炭素に直接結合している場合もある。置換基Rは、アミノ酸又は非アミノ酸の修飾された側鎖であってもよい。

上記置換基Rとしては、特に限定されない。例えば、Rとしては、式2； $-(CH_2)_n-P-Q$ （式中、 n は1～10の整数を示し、Pは、 $-CO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CO-O-$ 、 $-O-CO-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-S-$ 、 $-S-CO-$ 、 $-CS-S-$ 、 $-S-CS-$ 、 $-S-$ 、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 、 $-CO-NH-CO-$ 、 $-CS-NH-CS-$ 、 $-S-S-$ 、 $-CS-NH-$ 又は $-NH-CS-$ を示し、Qは、水素原子、又は C_{1-35} 、好ましくは C_{1-20} のアルキル基、 C_{6-20} のアリール基もしくは C_{7-16} のアラルキル基を示す。）で表わされる基、式3； $-P-Q$ （式中、P及びQは前記と同意義。）で表わされる基、又は式4； $-Q$ （式中、Qは前記と同意義。）で表わされる基等が挙げられる。なかでも、上記Rとしては、アミノ酸又は非ア

ミノ酸の α 炭素に直接結合している場合、炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さずに、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選ばれる結合により、 C_{1-35} 、好ましくは C_{1-20} のアルキル基、 C_{6-20} のアリール基又は C_{7-16} のアラルキル基が結合している基が好ましい。置換基Rがアミノ酸又は非アミノ酸の α 炭素に直接結合している場合、置換基Rは天然アミノ酸において α 炭素に結合している置換基を含まない。置換基Rがアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における反応性置換基に結合している場合、当該置換基Rは式4； $-Q$ （式中、Qは前記と同意義。）で表わされる基であることが好ましい。

10 ここで、上記「アルキル基」とは、環状、直鎖又は分枝鎖アルキル基を表し、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、*tert*-ペンチル基、ネオペンチル基、シクロペンチル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、シクロヘキシル基、3,3-ジメチルブチル基、ヘプチル基、1-プロピルブチル基、
15 オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基又はペンタデシル基等が挙げられ、これらは部分的に不飽和炭素結合を含んでいてもよく、炭素数は1乃至35、より好ましくは1乃至20、さらに好ましくは1乃至10である。

20 上記「アリール基」とは、例として、フェニル基、1-もしくは2-ナフチル基、ビフェニル基、1-, 2-もしくは9-アントリル基、1-, 2-, 3-, 4-もしくは9-フェナントリル基、アセナフチル基、アントラセニル基、アズレニル基等が挙げられる。炭素数は6乃至20、より好ましくは6乃至15である。

25 上記「アラルキル基」としては、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、3,4-ジメトキシベンジル基、*o*-ニトロベンジル基、*p*-ニトロベンジ

ル基、ベンズヒドリル基、トリチル基等が挙げられる。炭素数は、好ましくは7乃至16である。

さらに、これらアルキル基、アリール基及びアラルキル基は、当技術分野で通常用いられる置換基を化学的に許容される位置及び個数で有していてもよい。

「修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸」としては、アミノ酸又は非アミノ酸Aがセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-アミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン又はアスパラギンであり、置換基Rが式5； $-(CH_2)_n-P^1-Q^1$ （式中、nは前記と同意義。P¹は、エステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合を表し、Q¹は、前記Qと同意義。）で示される基である場合が好ましい。

具体的には、例えば、アミノ酸Aがセリン、スレオニン、チロシン又はオキシプロリンである場合、そのアミノ酸は側鎖に水酸基を有するから、「修飾をうけたアミノ酸」としては、側鎖の水酸基がエーテル化又はエステル化されているセリン、スレオニン、チロシン又はオキシプロリンが挙げられる。アミノ酸Aがシステインである場合は、そのアミノ酸は側鎖にメルカプト基を有するから、「修飾をうけたアミノ酸」としては、側鎖のメルカプト基がチオエーテル化、チオエステル化又はジスルフィド化されているシステインが挙げられる。アミノ酸Aがリジン、アルギニン又は2, 3-ジアミノプロピオン酸である場合は、側鎖にアミノ基を有するから、「修飾をうけたアミノ酸」としては、側鎖のアミノ基がアミド化、チオアミド化、カルバミド化、チオカルバミド化又はアルキル化されているリジン、アルギニン又は2, 3-ジアミノプロピオン酸が挙げられる。アミノ酸Aがヒスチジン、トリプトファン、プロリン又はオキシプロリンである場合は、側鎖にアミノ基を有するか

ら、「修飾をうけたアミノ酸」としては、側鎖のアミノ基がアミド化、チオアミド化、イミノエーテル化、イミノチオエーテル化、アルキル化されているヒスチジン、トリプトファン、プロリン又はオキシプロリンが挙げられる。

なかでも、「修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸」としては、側鎖の水酸基がエステル化されているセリン又はスレオニンが好ましい。

さらに、上記置換基Rとしては、アミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖に—OH、—SH、—NH—又は—NH₂を含む場合、これらをアシル化して形成される基がより好適な例として挙げられる。そのためのアシル基としては、例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基が挙げられる。前記有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35、より好ましくは6～18、最も好ましくは8～16である。そのような脂肪酸としては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、酪酸、カプロン酸、ウンデシル酸、パルミチン酸、デカン酸、ノナデカン酸、ベヘン酸、モンタン酸もしくはラクセン酸等の飽和脂肪酸、例えばアクリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸もしくはアアテアロール酸等の不飽和脂肪酸が挙げられる。不飽和脂肪酸はモノエンであってもよいし、ポリエンであってもよい。なかでも、オクタン酸（好ましくは、カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリン酸）、ドデカン酸（好ましくは、ラウリン酸）等が好適な例として挙げられる。前記有機スルホン酸又は有機リン酸化合物についても、その炭素数は2～35のものが好ましい。

「修飾ペプチド又は蛋白質」とは、ペプチド又は蛋白質中に、上述の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を、1以上含むペプチド又は蛋白質をいう。

「グレリン」とは、内因性成長ホルモン分泌促進因子（GHS）のことであり、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有する。なかでも、ヒト、ラット、マウス、ブタ、ニ

ワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマス又はイヌ由来のグレリンが好ましい。より具体的には、「グレリン」としては、配列番号 1～21 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有し、3 位セリン又はスレオニンの側鎖水酸基の水素原子が、*n*-オクタノイル基、ブタノイル基、ヘキサノイル基、デカノイル基又はドデカノイル基のいずれかで置換されている蛋白質、又は配列番号 1～21 のいずれに記載のアミノ酸配列において、N 末端の 1 番目から 4 番目までのアミノ酸配列以外の部分で、1～10 個、好ましくは 1～数個程度のアミノ酸が置換、付加又は欠失しているアミノ酸配列を有し、3 位セリン又はスレオニンの側鎖水酸基の水素原子が、*n*-オクタノイル基、ブタノイル基、ヘキサノイル基、デカノイル基又はドデカノイル基のいずれかで置換されており、かつ細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する蛋白質が挙げられる。

「グレリン誘導体」としては、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を 1 以上含むことを特徴とするペプチド又はその薬学的に許容される塩が挙げられる。なかでも、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から 4 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 5 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 6 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 7 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 8 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 9 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 10 番目までのアミノ酸配列を少なくとも有するペプチド又はその薬学的に許容される塩が好ましい。さらに、配列番号 1～21 に記載のアミノ酸配列において、アミノ末端から 4 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 5 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 6 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 7 番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から 8 番目までのアミノ酸配列、好ましくは

アミノ末端から9番目までのアミノ酸配列、好ましくはアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列以外の部分で、少なくともひとつのアミノ酸、好ましくは1～10個程度のアミノ酸、より好ましくは1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含むペプチド又はその薬学的に許容される塩が好ましい。なかでも、上記態様の全てのペプチド又はその薬学的に許容される塩においては、アミノ末端から2番目又は3番目のアミノ酸、より好ましくはアミノ末端から3番目のアミノ酸が、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸であることが特に好ましい。

また、配列番号1～21に記載のアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列の少なくともひとつのアミノ酸、好ましくは1～10個程度のアミノ酸、より好ましくは1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列において、アミノ末端から4番目までのアミノ酸配列が、式6；A－B－C－D－（式中Aはアミノ酸、非アミノ酸、又ははないことを示し、Bはアミノ酸、非アミノ酸、又ははないことを示す。ただし、A＋Bの分子鎖長がジペプチド相当長ある。C又はDは同一であっても異なってもよく、（a）修飾されたアミノ酸、（b）疎水性側鎖を有するアミノ酸、又は（c）塩基性側鎖を有するアミノ酸を示す。）で表されるペプチド断片に置き換えられているペプチド又はその薬学的に許容される塩も好ましい態様として挙げられる。前記「疎水性側鎖を有するアミノ酸」としては、ロイシン、バリン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン等、あるいは、これらのN－メチルアミノ酸又はD－体などが挙げられる。前記「塩基性側鎖を有するアミノ酸」としては、リジン、アルギニン又はヒスチジン又はこれらのD－体などが挙げられる。中でも、前記式6中、Cが、上記修飾をうけたアミノ酸であり、Dが疎水性側鎖を有するアミノ酸であることがより好ましい。

前記式6；A－B－C－D－で表されるペプチド断片の代わりに、次式7；

$A^1-B^1-C^1-D^1-$ (式中、 A^1 はアミノ酸又は非アミノ酸、好ましくは天然アミノ酸又はそのD-体を示す。 B^1 又は C^1 は、少なくとも一方が修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ酸であり、 B^1 又は C^1 のうち一方のみが修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ酸である場合、他方は修飾を受けていないアミノ酸又は非アミノ酸、好ましくは天然アミノ酸又はそのD-体である。また、 A^1+B^1 の分子鎖長がジペプチド相当長ある。 D^1 は、疎水性側鎖を有するアミノ酸又は塩基性側鎖を有するアミノ酸を示す。) で表されるペプチド断片を用いてもよい。

また、前記式 6 ; $A-B-C-D-$ で表されるペプチド断片の代わりに、
次式 8 ; $B^2-C^2-D^2-$ (式中、 B^2 は、ジペプチド相当長の分子鎖長を有する非アミノ酸であり、 C^2 は修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ酸であり、 D^2 は、疎水性側鎖を有するアミノ酸又は塩基性側鎖を有するアミノ酸を示す。) で表されるペプチド断片を用いてもよい。

さらに、「グレリン誘導体」としては、上述のような態様のペプチド又はその薬学的に許容される塩のアミノ末端やカルボキシル末端に修飾が施されていてもよい。具体的には、上述のような態様のペプチド又はその薬学的に許容される塩のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることが好ましい。また、上述のような態様のペプチド又はその薬学的に許容される塩のアミノ末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR₂R₃ (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R₂ 及び R₃ は、水素原子及び低級 (C₁₋₆) の分枝鎖又は直鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す) に変換されていることが好ましい。さらには、これらの修飾が組み合わされていてもよい。

本発明にかかる修飾ペプチド又は蛋白質を製造する方法は、(a) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護ペプチド断片を、弱酸性離脱樹脂を用いて製造し、また (b) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護ペプチド断片を、前記 (a) の保護ペプチド断片とは別個に製造し、前記 (a) 及び (b) で製造された保護ペプチド断片を縮合するという3工程からなることを特徴とする。

以下に、修飾ペプチド又は蛋白質の製造における各工程についてより具体的に述べる。

本発明の製造方法によって得られる修飾ペプチド又は蛋白質、又はそれらの断片はペプチド性のものであるので、自体公知のペプチド合成法によって合成することができる。ここで、修飾ペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片とは、これらの反応性官能基が保護基で保護された化合物も含む。ペプチドの合成方法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。即ち、粗修飾ペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離方法としては、例えば、以下の文献1～3に記載された方法が挙げられる。

1. 泉屋信夫他「ペプチド合成の基礎と実験」丸善株式会社発行 (1985 年)
2. 矢島治明及び榊原俊平「生化学実験講座1、蛋白質の化学 IV」日本生化学会編、東京化学同人発行 (1977 年)
3. 矢島治明監修「続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成」廣川書店発行

修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護ペプチド断片を製造する工程は、弱酸性離脱樹脂上でペプチド鎖を延長する固相化学合成を用いることを特徴とする。より具体的には、弱酸性離脱樹脂を用い、 α -アミ

ノ基と側鎖における、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基を適当に保護したアミノ酸又は非アミノ酸を、目的とするペプチド断片の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、弱酸性離脱樹脂上で縮合させ、作製された保護ペプチド断片を保護基を脱離させることなく弱酸性離脱樹脂から離脱させることにより、目的とする保護ペプチド断片を得ることができる。

上記弱酸性離脱樹脂とは、ペプチド合成に用いられる樹脂であって、樹脂上に作製されたペプチド断片を弱酸性条件で樹脂から離脱させることができる樹脂をいう。例えば、弱酸性離脱樹脂としては、酢酸、トリフルオロ酢酸もしくはギ酸などのカルボン酸類、およびトリフルオロエタノールもしくはヘキサフルオロイソプロパノールなどのフッ素化アルコール類からなる群からなる1以上の化合物を含む溶液中で、樹脂上に作製されたペプチド断片を樹脂から離脱させることができる樹脂が好ましい。より具体的には、弱酸性離脱樹脂としては、例えば、2-クロロトリチル樹脂、トリチル樹脂、4-メチルトリチル樹脂、4-メトキシトリチル樹脂、Rink Amide Barlos 樹脂等のトリチル系樹脂や、Sieber Amide 樹脂等を挙げることができる。

α -アミノ基と側鎖における反応性官能基(以下単に、側鎖官能基という。)の保護基としては、特に限定されない。例えば、 α -アミノ基の保護基としては、 t -ブトキシカルボニル (Boc)、トリクロロエチルオキシカルボニル、 t -アミルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc)、メチルスルホニルエトキシカルボニル、トリクロロエトキシカルボニル、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニルもしくはピリジン-4-メトキシカルボニル等の置換基を有していてもよいアルコキシカルボニル基；シクロペプチルオキシカルボニルもしくはシクロヘキシルオキシカルボニル等の置換基を有していてもよいシクロアルキルオキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル (Z)、 p -メトキシベンジルオキシカルボニル (p

MZ)、p-クロロベンジルオキシカルボニル (Cl-Z)、p-ブロモベン
ジルオキシカルボニル (Br-Z)、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、
アダマンチルオキシカルボニル、2-フェニルイソプロピルオキシカルボニ
ル、p-メチルフェニルイソプロピルオキシカルボニル、p-ビフェニルイ
5 ソプロピルオキシカルボニル、3, 5-ジメトキシ- α , α -ジメチルベン
ジルオキシカルボニル等の置換基を有していてもよいアラキルオキシカル
ボニル基；ベンジル (Bz1)、ベンズヒドリル、トリチル等の置換基を有し
ていてもよいアラキル基；トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、
ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニル (Ts)、o-ニトロフェニル
10 スルフェニル、2, 4-ジニトロフェニルスルフェニル、3-ニトロ-2-
ピリジルスルフェニル等の置換基を有していてもよいアシル基；ジチアスク
シノイル、2-ニトロフェニルチオ、ジフェニルホスフィニル、ジフェニル
ホスフィノチオイル、ジメチルホスフィノチオイル等が挙げられる。

セリン等の水酸基は、例えば、アセチル基等の低級 (C_{1-6}) アルカノイル
15 基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシ
カルボニル基等の炭酸から誘導される基等で保護できる。

アルギニンのグアニジノ基は、例えば、ニトロ基、Z基、Ts基、p-メ
トキシベンゼンスルホニル基 (Mbs)、4-メトキシ-2, 6-ジメチルベン
ゼンスルホニル基 (Mds)、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベン
20 ゼンスルホニル基 (Mtr)、メシチレン-2-スルホニル基 (Mts)、2,
3, 4, 5, 6-ペンタメチルベンゼンスルホニル基 (Pme)、2, 4, 6-
トリメトキシベンゼンスルホニル基 (Mtb)、2, 2, 5, 7, 8-ペン
タメチルクロマン-6-スルホニル基 (Pmc)、2, 2, 4, 6, 7-ペン
タメチル-ジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル基 (Pbf) 等で保護で
25 きる。

また、システインのメルカプト基は、例えば、トリチル基、アセトアミド

メチル (Acm) 基、tert-ブチル基、ベンジル基、p-メチルベンジル基、p-メトキシベンジル基、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基、ブチルチオ基等で保護できる。

ヒスチジンのイミダゾリル基の保護基としては、例えば、Boc基、トリ
5 チル (Trt) 基、Ts基、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼ
ンスルホニル基、2, 4-ジニトロフェノール (DNP) 基、ベンジルオキ
シメチル (Bom) 基、t-ブトキシメチル (Bum) 基、Fmoc基等が
用いられる。

また、トリプトファンのインドリル基は、例えば、ホルミル基、Z基、2,
10 4-ジクロロベンジルオキシカルボニル基、トリクロロエチルオキシカルボ
ニル基、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基、2,
4, 6-トリメトキシベンゼンスルホニル基等で保護できる。

固相合成法による縮合反応は、上述の弱酸性離脱樹脂にアミノ酸を1個ず
つ順次縮合させる逐次延長法、2個以上のアミノ酸で構成されたペプチド断
15 片を縮合させる断片縮合法やこれらの方法を組み合わせた方法の何れの方法
で行ってもよい。前記2個以上のアミノ酸で構成されたペプチド断片は、各
アミノ酸から慣用の液相法、固相法等により製造することができる。

まず、上記のような α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸
又は非アミノ酸（以下、特に断りのない限り、保護アミノ酸と略称する。）を
20 活性化し、弱酸性離脱樹脂に活性化された保護アミノ酸を縮合する。その際、
保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド
縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例え
ば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-
メチルピロリドン等の酸アミド類；塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲ
25 ン化炭化水素類；トリフルオロエタノール、フェノール等のアルコール類；
ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類；ピリジン、ジオキサン、テトラ

ヒドロフラン等のエーテル類；アセトニトリル，プロピオニトリル等のニトリル類；酢酸メチル，酢酸エチル等のエステル類又はこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応の反応温度と同一であってよく、通常約 -20°C ～ 50°C 程度の範囲から適宜選択される。活性化された保護アミノ酸は通常1～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸又はアセチルイミダゾールを用いて未反応保護アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

ついで、弱酸性離脱樹脂に縮合された保護アミノ酸に、所望の配列どおりに、保護アミノ酸を縮合させていく。各保護アミノ酸の縮合反応は、慣用の方法、例えば、C端活性化法、カップリング試薬を用いるカップリング法等により行うことができる。C端活性化法には、活性エステル法、対称酸無水物法等が含まれる。前記活性エステル法で用いる活性エステルとしては、例えば、シアノメチルエステル等のアルキルエステル；チオフェニルエステル、p-ニトロチオフェニルエステル、p-メタンスルホニルフェニルエステル、p-ニトロフェニルエステル、2，4-ジニトロフェニルエステル、2，4，6-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル等のフェニルエステル；1-ヒドロキシスクシンイミド（HOSu）、N-ヒドロキシフタル酸イミドエステル、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2，3-ジカルボン酸イミド（HONB）等のジカルボン酸イミドエステル；8-ヒドロキノリンエステル、N-ヒドロキシピペリジンエステル、2-ヒドロキシピリジンエステル等のヒドロキシルアミン誘導体等が挙げられる。

上記カップリング試薬を用いるカップリング法としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、水溶性カルボジイミド（WSC）等を

用いるカルボジイミド法；DCC-アディティブ法；カルボニルジイミダゾール（CDI）法；ウッドワード（Woodward）反応剤（N-エチル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホン酸塩）もしくはN-エチル-2'-ヒドロキシベンズイソオキサゾリウムトリフルオロホウ酸塩等のイソオキサゾリウム塩、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキシキノリン（EEDQ）、1-エトキシカルボニル-2-イソブトキシ-1, 2-ジヒドロキシキノリン（IIDQ）、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス（ジメチルアミノ）-フォスホニウムヘキサフルオロフォスフェート（BOP）、O-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロフォスフェート（HBTU）、O-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチル-ウロニウム-テトラフルオロボレート（TBTU）、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）を用いる方法等が例示される。

上記カルボジイミド法で用いられる水溶性カルボジイミド（WSC）には、例えば、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）、N-シクロヘキシル-N'-モルホリノエチルカルボジイミド、N-シクロヘキシル-N'-（N, N-ジエチルアミノ）シクロヘキシルカルボジイミド等が含まれる。水溶性カルボジイミドは、塩酸塩等の塩であってもよい。

また、上記DCC-アディティブ法には、例えば、DCC-HOSu法、DCC-HOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）法、DCC-HONB法、DCC-2-ヒドロキシイミノ-2-シアノ酢酸エチルエステル法、WSC-HOSu法、WSC-HOBt法等が含まれる。

好ましい縮合反応には、カルボジイミド法、活性エステル法、DCC-アディティブ法が含まれる。さらに好ましい縮合反応には、ラセミ化を抑制する方法、例えば、活性エステル法、DCC-アディティブ法（例えば、DC

C-HOBt法、DCC-HOSu法、WSC-HOSu法、WSC-HOBt法等)等が含まれる。

5 目的とする保護ペプチド断片には、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む。ペプチド鎖に修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を挿入する方法としては、下記2通りの方法が挙げられる。

第一の方法としては、所望のアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖を特異的に予め修飾しておき、かかるアミノ酸又は非アミノ酸（以下、残基特異的に修飾されたアミノ酸又は非アミノ酸という。）を、ペプチド鎖の伸長段階で導入する
10 という方法が挙げられる。より具体的には、残基特異的に修飾されたアミノ酸又は非アミノ酸（これらの α アミノ基に保護基を付した化合物を含む）は、自体公知の合成方法によって合成することができる。例えば、エステル化反応、アミド化反応、エーテル化反応、アシル化反応、アルキル化反応などが挙げられ、これらは当業者に周知の方法により行われ得る。さらに、
15 これを前述した縮合反応のいずれかによりペプチド鎖に導入することができる。この場合、その弱酸性離脱樹脂からの保護ペプチド断片の脱離は後述する条件から適宜選択されるが、好ましくは目的とする残基特異的に修飾されたアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の置換基Rを脱離させない条件から適宜選択されることが好ましい。

20 第二の方法としては、アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有するペプチド断片を上記方法により作製し、その後、所望のアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖を特異的に修飾する（以下、残基特異的修飾という。）という方法が挙げられる。前記の残基特異的修飾の方法は特に限定されず、公知の方法を用いてよい。例えば、エステル化反応、アミド化反応、エーテル
25 化反応、アシル化反応、アルキル化反応などが挙げられ、これらは当業者に周知の方法により行われ得る。さらに、リン酸化修飾する方法としては、

Tetrahedron Letter, 41 巻, p. 4457-4461, 2000 年、Biopolymers, 60 巻, p. 3-31, 2001 年等が挙げられる。また、糖修飾する方法としては Int. J. Peptide Protein Res., 42 巻, p. 165-170, 1993 年、Science, 291 巻, p. 2344-2350, 2001 年、Science, 291 巻, p. 2357-2364, 2001 年等が挙げられる。

- 5 かかる方法は、下記 2 通りの場合に分けられる。即ち、残基特異的修飾を施すアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の官能基が保護基により保護されている場合、かかる保護基の脱保護の際に同時に保護ペプチド断片が樹脂から離脱してしまう場合と、かかる保護基の脱保護の際には保護ペプチド断片は樹脂から離脱しない場合とに大別される。前者の場合、C 末端のカルボキシル基を保護基により保護した後、自体公知の合成方法により残基特異的修飾を施し、その後、C 末端のカルボキシル基を後述する方法から適宜選択して脱保護することにより目的のペプチド断片を得ることができる。また、後者の場合、樹脂上で自体公知の合成法により残基特異的修飾を施すことができ、その後、目的のペプチド断片を、後述する方法から適宜選択して樹脂から離脱すればよい。
- 10
- 15

本発明においては、アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有するペプチド断片を上記方法により作製し、その後、残基特異的修飾を施すアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の反応性官能基が保護基により保護されている場合は、その保護基を脱保護し、樹脂上で自体公知の合成法により残基特異的修飾を施し、ついで、後述する弱酸性離脱樹脂からの保護ペプチド断片の離脱、及び所望により各保護基の脱保護を行うという方法が最も好ましい。

20

上記方法において、残基特異的修飾を施すアミノ酸又は非アミノ酸の保護基としては、かかる保護基を脱保護する際に保護ペプチド断片が樹脂から離脱しないものであれば特に限定されないが、好ましくは t -ブチルジメチルシリル基、 t -ブチルジフェニルシリル基等のシリル基等が挙げられる。こ

25

のような保護基を脱保護する際は、保護ペプチド断片が樹脂から離脱されず、かつ、残基特異的修飾を施すアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖官能基の保護基を特異的に脱保護することができる試薬を用いる。かかる試薬は、弱酸性離脱樹脂及び前記保護基の種類に応じて適宜選択されるが、前記保護基がシリル基である場合は、フッ化四級アンモニウムを用いることが好ましく、テトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)を用いることがより好ましい。

上記のように保護基を選択すると、ペプチド伸長の縮合のためN末端アミノ基を脱保護する際に、各保護アミノ酸の側鎖官能基の保護基及び弱酸性離脱樹脂から保護ペプチド断片が脱離せず、また、得られたペプチド樹脂結合体から弱酸性離脱樹脂を脱離する際に、各アミノ酸残基の側鎖官能基の保護基が脱離しない。しかも、このことに起因して、副反応物の生成を抑制することができる。そのため、側鎖官能基が保護基により保護されたペプチド断片を、高い純度で収率よくしかも簡易に得ることができる。このペプチド断片は、側鎖官能基が保護されているので、新たに保護基を導入する必要がなく、次工程において、液相法により目的とする修飾ペプチド又は蛋白質を製造する際の原料として、好適に使用することができる。

最後に、作製された保護ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させる。このとき、保護ペプチド断片における保護基、即ち、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖官能基の保護基が脱保護されない弱酸性条件で行う。弱酸性条件とは、例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸もしくはギ酸などのカルボン酸類、および／またはトリフルオロエタノールもしくはヘキサフルオロイソプロパノールなどのフッ素化アルコール類を含む溶液中に、弱酸性離脱樹脂を懸濁させた条件が挙げられる。具体的には、上記溶液中で、所望時間、好ましくは5分～4時間程度、より好ましくは10分～2時間程度攪拌することにより、作製された保護ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させることができる。

より具体的には、例えば、Barlos らの方法 (Tetrahedron Lett, Vol.30, p. 3947, 1989) 等に記載されている公知の方法、例えば、0.5%トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン、あるいは酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン=1/2/7、あるいは酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン=2/2/6 等の溶媒に懸濁させる方法に従えばよい。

本発明においては、ペプチド鎖に修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を挿入することなく、保護ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させ、ついで所望のアミノ酸残基に残基特異的修飾を施すことによって、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含むペプチド断片を製造することができる。残基特異的修飾の方法は、上記と同一である。

以上述べてきた製造方法は、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護ペプチド断片であれば、特に制限なく適用されうる。中でも、下記式9で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護ペプチド断片又はその塩の作製に、上記方法を用いるのが好ましい。

即ち、式9 ; $(R1)_n - Gly - Ser(X1) - A(R) - Phe - Leu - Ser(X2) - Pro - OR2$

(式中、 $-A(R)-$ は、上記修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ化合物である。なかでも、Aは、セリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-アミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン、アスパラギンが好ましく、Rは、アシル基、糖、リン酸基、硫酸基、アルキル基、アラルキル基、アロイル基等の修飾基が好ましく、RがAの側鎖の反応性置換基にエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合を介して結合していることが好ましい。

R1は、t-ブトキシカルボニル(Boc)、トリクロロエチルオキシカル

ボニル、*t*-アミルオキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc)、メチルスルホニルエトキシカルボニル、トリクロロエトキシカルボニル、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニルもしくはピリジン-4-メトキシカルボニル等の置換基を有していてもよいアルコキシカルボニル基；シクロペプチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル等の置換基を有していてもよいシクロアルキルオキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル (Z)、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル (PMZ)、*p*-クロロベンジルオキシカルボニル (Cl-Z)、*p*-ブromoベンジルオキシカルボニル (Br-Z)、*p*-ニトロベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、2-フェニルイソプロピルオキシカルボニル、*p*-メチルフェニルイソプロピルオキシカルボニル、*p*-ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、3,5-ジメトキシ- α , α -ジメチルベンジルオキシカルボニル等の置換基を有していてもよいアラキルオキシカルボニル基；ベンジル (Bzl)、ベンズヒドリル、トリチル等の置換基を有していてもよいアラキル基；トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、ベンゼンスルホニル、*p*-トルエンスルホニル (Ts)、*o*-ニトロフェニルスルフェニル、2,4-ジニトロフェニルスルフェニル、3-ニトロ-2-ピリジルスルフェニル等の置換基を有していてもよいアシル基；ジチアスクシノイル、2-ニトロフェニルチオ、ジフェニルホスフィニル、ジフェニルホスフィノチオイル、ジメチルホスフィノチオイルを示し、

n は、1もしくは2であり、

X1及びX2は、セリン側鎖の水酸基の保護基を示し、アセチル基等の低級 (C₁₋₆) アルカノイル基；ベンゾイル基等のアロイル基；ベンジルオキシカルボニル基もしくはエトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基を示すか、又は、側鎖に上述の置換記Rをエーテル結合を介して結合させるというエーテル化に適する基として、例えば、*t*-ブチル基、ベンジル基、テ

トラヒドロピラニル基、トリチル基、*t*-ブチルジメチルシリル基等のシリル基を示し、

R²は、保護基又は保護基が無いことを示し、保護基がある場合は、アルキルエステル基（例えば、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、*n*-ブチルエステル、*t*-ブチルエステル、シクロペンチルエステル、シクロヘキシルエステル、シクロヘプチルエステル、シクロオクチルエステル、2-アダマンチルエステル等の直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル基）、アラルキルエステル基（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル基）、フェナシルエステル基、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド基、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド基、トリチルヒドラジド基を示す。）

で表されるペプチド又はその塩等である。

式9中、R¹はBoc基、Z基、pMZ基又はFmoc基が好ましく、X¹及びX²で表される保護基としては、好ましくは*t*-ブチル基又は3,4-ベンジル基、さらに好ましくは*t*-ブチル基が挙げられる。R²は、水素あるいはチオエステル基が好ましい。

さらに、以上述べてきた製造方法は、グレリン、好ましくはヒト、ラット、マウス、ブタ、ニワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマスもしくはイヌのグレリン、又はグレリン誘導体を製造する際に好適に用いられる。また、前記グレリン又はグレリン誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含む部分を製造する際にも好適に用いられる。前記各生物のグレリンの構造は、第1表に記載している。

より具体的には、(a)配列番号1~21のいずれかに記載のアミノ酸配列において、少なくともN末端の1番目から4番目のアミノ酸配列を有し、好ましくは当該アミノ酸配列においてN末端の1番目から5番目のアミノ酸配

列からなるか、又は当該アミノ酸配列においてN末端の1番目から7番目のアミノ酸配列からなり、(b) N末端から3番目のセリン又はスレオニンの側鎖の水酸基が、アシル化、好ましくは飽和又は不飽和の炭素数2～35、好ましくは6～18のアルキル基によりアシル化されており、(c) アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基、好ましくは水酸基及びアミノ基が保護基により保護されているペプチド断片の製造に、以上述べてきた製造方法は有用である。

10

本発明においては、修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護ペプチド断片を、前記修飾を受けたアミノ酸又は非アミノ酸を含む保護ペプチド断片とは別個に製造する。

本発明におけるペプチド又は蛋白質の、アシル化、糖化、リン酸化等の修飾を受けたアミノ酸もしくは非アミノ酸を含まないペプチド断片は、自体公知の遺伝子組換え法もしくは酵素法により製造することができる。例えば、前記ペプチド断片のアミノ酸配列を有するペプチド（以下、目的ペプチドという。）をコードする塩基配列を有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から目的ペプチドを採取する工程、及び前記工程で得られた目的ペプチドの側鎖官能基のうち、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する官能基を保護基により保護する工程を含む方法により製造することができる。発現ベクターの作製方法は、当技術分野における常法に従って行うことができる。発現ベクター作製の際には、目的ペプチドの高発現に必要なその他の要素、例えばプロモーター、ターミネーター、スプライス部位等についても従来の方法において既に知られているものを適宜用いることができる。前記発現ベクターにより形質転換される宿主細胞も特に限定さ

25

れるものではなく、従来の方法において既に用いられている原核細胞又は真核細胞、例えば大腸菌等の微生物細胞、酵母又は動物細胞等から、目的ペプチドをコードする塩基配列が好適に発現できるものを適宜選択して用いることができる。目的ペプチドの側鎖官能基の保護も、上述と同一の方法で行えばよい。

5 ばよい。

修飾を受けたアミノ酸もしくは非アミノ酸を含まないペプチド断片は、工程（１）；（a）目的ペプチドに所望によりリンカー配列を介して保護ペプチドが付加されている融合蛋白質をコードする塩基配列を有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から前記融合蛋白質を採取する工程；

10 採取する工程；

工程（２）；工程（１）において得られた融合蛋白質から、保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドと切断分離し、所望によりさらに精製する工程；

工程（３）；（２）で得られた目的ペプチドの側鎖官能基のうち、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する官能基を保護基により保護する工程；
15 を含む方法により製造することもできる。

保護ペプチドは、目的ペプチドが宿主細胞内で酵素により分解されるのを抑制する目的で用いられるものであり、当該目的を達成できるものであれば特に限定されないが、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに係るアミノ酸配列を有するフラグメントを用いることができる。当該酵素に係るアミノ酸配列は当業者にとって公知であり、 β -ガラクトシダーゼ由来のペプチドフラグメントは広く当業者により融合蛋白法における保護ペプチドとして用いられている。

リンカー配列は、工程（２）において保護ペプチドと目的ペプチドとの切断分離に適した酵素がない等、保護ペプチドと目的ペプチドとの切断分離がうまくいかない場合、保護ペプチドと目的ペプチドとの間に挿入される配列

25 切断分離に適した酵素がない等、保護ペプチドと目的ペプチドとの切断分離が

である。従って、工程（２）においてリンカー配列と目的ペプチドとの切断分離がうまくいくように、その配列を適宜選択することができる。

保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドと切断分離は、酵素的又は／及び化学的な方法で行うことができる。

- 5 酵素的及び化学的な切断方法としては Methods in ENZYMOLOGY, 185 巻, Gene Expression Technology (David V. Goeddel 編集、出版社 ACADEMIC PRESS, INC) に記載されている方法も用いることができる。

- 化学的切断方法としては、メチオニンのC末端側をブロムシアンで切断する方法 (D. V. Goeddel et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, p106-110, 10 1979)、-Asp-Pro-配列の間を蟻酸で切断する方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 40, p1173, 1970)、-Asn-Gly-配列の間をヒドロキシルアミンで切断する方法及びトリプシンのC末端側を BNPS-スカトール又は N-クロロスクシンイミドで切断する方法等が挙げられる。例えば、目的ペプチドに係るアミノ酸配列中にメチオニンが含まれない場合は目的ペプチドに隣接する
15 切断部位領域の末端にメチオニンを導入し、ブロムシアン処理により化学的に切断部位領域での切断を行うことができる。

- また、酵素的切断方法としては、切断処理に用いる酵素が基質として特異的に認識することができる切断部位領域を設定すれば良く、それらの例としては、アルギニン-アルギニン、リジン-リジン、アルギニン-リジンおよび
20 ビリジン-アルギニンの塩基性アミノ酸対の中央のペプチド結合、またはアルギニン-メチオニン、アルギニン-アラニンもしくはアルギニン-バリンのアミノ酸対の中央のペプチド結合を大腸菌 Omp T プロテアーゼ (Sugimura, K. and Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988) で、X-Gly 又は Pro-X-Gly-Pro 配列の -X-Gly- 配列の間をコラゲナーゼ
25 (Collagenase) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, p4692-4696, 1984) で、-Asp-Asp-Asp-Lys-配列 (配列番号: 22) の Lys のC末端側をエンテロ

キナーゼ (Enterokinase) で、-Ile-Glu-Gly-Arg-配列 (配列番号: 23) の Arg のC末端側を血液凝固因子 Xa (blood coagulation Factor Xa) (特開昭 61-135591) で、-Gly-Pro-Arg-配列の Arg のC末端側をトロンビン (Thrombin) (特開昭 62-135500) で、-Arg-のC末端側をトリプシン (Trypsin) 又はクロストリパイン (Clostripain) で、Arg 又は Lys のC末端側をエンドプロテアーゼ (endoprotease) Arg-C (Nature, Vol. 285, p456-461, 1980) で、Lys-Arg、Arg-Arg 又は Pro-Arg 配列のC末端側をサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) Kex2 プロテアーゼ及びその誘導体 (Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 144, p807-814, 1987、特開平 1-199578、特開 10 平 10-229884) で、Lys のC末端側をリシル エンドペプチダーゼ (lysyl endopeptidase) 又はエンドペプチダーゼ (endopeptidase) Lys-C (特開昭 61-275222) で、Asp 又は Glu のC末端側をスタフィロコッカス・アウレウス (*S. aureus*) V8 プロテアーゼ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 69, p3506-3509, 1972) で、-Phe-Arg-配列のC末端側をカリクレイン (Kallikrein) (特開昭 15 62-248489) で、-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-配列 (配列番号: 24) の Leu-Leu の間をレニン (renin) で (特開昭 60-262595)、-Glu-Gly-Arg-配列のC末端側をウロキナーゼ (Urokinase) (特開平 2-100685) で、Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 配列 (配列番号: 25) のC末端側をエンテロペプチダーゼ (entero-peptidase) (Biotechnology, Vol. 6, p1204-1210, 1988) 20 で、poly-Gly のC末端側をリソスタフィン (lysostaphin) (特開平 1-160496) で、Lys-Arg、Arg-Arg 又は Pro-Arg 等のC末端側をクリベロミセス・ラクチス (*Kluverromyces lactis*) (特開平 1-124390) で切断する方法等が挙げられる。

本方法における発現ベクター、宿主細胞及び目的ペプチドの側鎖官能基の 25 保護については、上記方法と同様である。

さらに、遺伝子組換え法もしくは酵素法を用いた修飾を受けたアミノ酸もし

くは非アミノ酸を含まないペプチド断片の製造方法は、国際公開番号：W099/38984 に記載されている方法を用いることもできる。

5 修飾を受けたアミノ酸もしくは非アミノ酸を含まないペプチド断片が、グレリン及びグレリン誘導体の修飾を受けたアミノ酸もしくは非アミノ酸を含まないペプチド断片（以下、グレリン断片（非修飾成分）という。）である場合、国際公開番号：W0 01/07475 に、遺伝子組換え法及び酵素法による製造方法が記載されている。

さらに、国際公開番号：W0 00/52193 に記載されている Glucagon like
10 peptide-1 の生産で使用している保護たんぱく質及びリンカー配列を適応させて、Omp Tプロテアーゼ又はその誘導体、ならびにKex 2プロテアーゼ又はその誘導体による２段階酵素法を用いてもグレリン断片（非修飾成分）を製造することができる。この方法では宿主である大腸菌の内在性Omp Tプロテアーゼを活用することが可能なため、酵素を別途調製する必要がない。
15 前記Omp TプロテアーゼまたはKex 2プロテアーゼの誘導体としては、Omp TプロテアーゼまたはKex 2プロテアーゼと同一の活性を有するものであれば特に限定されない。Omp Tプロテアーゼ誘導体としては大腸菌のOmp Pプロテアーゼ、サルモレラのpgt Eプロテアーゼに代表されるOmpTin ファミリーに属する酵素やOmp Tプロテアーゼの活性部位を含む部
20 分ペプチドなどが挙げられ、Kex 2プロテアーゼ誘導体としては、特開平10-229884 に記載の誘導体およびFurin、PC1/3に代表されるKex 2ファミリーに属する酵素などが挙げられる。

本方法では、実施例 13 に示すように、国際公開番号：W0 00/52193 に記載されているリンカー配列 EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR（配列番号
25 26）の代わりに、当該配列における35番目プロリン残基をアルギニン残基に置換した配列 EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR（配列番号27）

をリンカー配列として用いることにより、Omp Tプロテアーゼ及びKex 2プロテアーゼを使用した２段階酵素処理法で、グレリン断片（非修飾成分）、なかでもグレリン（８－２８）断片、特にヒトグレリン（８－２８）断片を効率よく得ることができる。新たに見出された配列番号２７に記載のリンカー配列内にはOmp Tプロテアーゼの切断認識部位以外にも別箇に切断認識部位が生じるにもかかわらず、目的の部位でのみ正常に切断が起きている（実施例３参照）。

さらに、保護ペプチド断片（非修飾成分）を精製・保存する際に、精製又は保存に用いる溶液のpHを４－８に調整することにより保護基の離脱を防ぐことができる。そして、保護基の脱離を抑制することにより、高回収率で高純度の修飾ペプチド又は蛋白質を調製することができる。前記精製又は保存に用いる溶液としては、水溶液が好ましい。具体的には、水、好ましくは限外ろ過水、酢酸ナトリウム溶液などが挙げられる。水溶液中での保護ヒトグレリン（８－２８）断片の安定性を調べた実施例１５から明らかなように、Boc基により保護されたペプチド断片は水溶液状態によってその安定性が異なり、特にpH２以下の水溶液状態においては明らかな本保護基の離脱が認められたことから、保護基としてBoc基を用いた場合は、特に精製・保存時の溶液のpHを４－８の間に設定することが好ましい。

ついで、本発明においては、以上のようにして得られた（ａ）修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を１以上含む保護ペプチド断片と、（ｂ）修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護ペプチド断片とを、縮合し、所望により、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖官能基の保護基を脱保護する。

上記縮合反応は、液相法により行われることが好ましい。また、上記（ａ）及び（ｂ）のペプチド断片を液相法により縮合する反応において、前記ペプチド断片の各アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖官能基は、通常、保護基で保護

されている。前記保護基としては、各官能基の保護基として上記に例示した保護基が挙げられる。好ましい保護基としては、前記（a）及び（b）の保護ペプチド断片の保護基を、同様の脱離条件下で脱離することができる保護基が挙げられる。なお、この場合には、弱酸性離脱樹脂がすでに脱離してい

- 5 るため弱酸性離脱樹脂の脱離条件を考慮する必要はなく、また、この場合の側鎖官能基の保護基としては、N末端アミノ基の脱離条件で脱離する保護基がより好ましい。

- 前記（a）及び（b）の保護ペプチド断片を液相法により縮合する反応において、縮合に用いる試薬や条件等は上述のアミノ酸縮合反応において記載
- 10 したもののから適宜選択される。好ましくは、ペプチド又は蛋白質のラセミ化異性体等の不純物をより副生しにくい方法から選択される。特に、縮合に用いる試薬（縮合剤）としては、例えば、2-（1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオ
- 15 ロホスフェート（HBTU）、2-（1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル）-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート（TBTU）、ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）、ジフェニルホスホロシアニデート（DEPC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）又は1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）等が好適な例として挙げ
- 20 られる。中でも、縮合剤が、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）又は1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）であり、前記縮合剤を用いるペプチド断片の縮合が、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）、1-ヒドロキシスクシンイミド（HOSu）又は3, 4-ジヒドロ-3-ヒ
- 25 ドロキシー-4-オキソ-ベンゾトリアジン（HOObt）の存在下、行われることがより好ましい。

縮合した反応生成物において、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖の保護基は適宜脱保護することができる。この場合における脱保護の試薬や条件等は、好ましくは、ペプチド又は蛋白質のラセミ化異性体等の不純物をより副生しにくい方法から選択される。

- 5 各保護基の脱離条件は、例えば、前記「ペプチド合成の基礎と実験」等に記載されている公知の方法に従えばよい。保護基の脱離方法には、強酸、弱酸、塩基、還元試薬（接触還元、金属、チオール等）、酸化試薬、親核試薬、親電子試薬、イオン、電子、光、溶媒、酵素等をそれぞれ利用する方法があり、前記保護基の選択には、これらの脱離方法の脱離条件を考慮して行うこと
10 ができる。

- 保護基の除去方法（脱保護反応）としては、例えば、トリフルオロ酢酸、酢酸、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、あるいはこれらの混合液等（好ましくはトリフルオロ酢酸、酢酸等）による酸処理；ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピ
15 ペラジン等による塩基処理；Pd-炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元；酢酸中亜鉛末処理（Zn/AcOH）；又は、テトラブチルアンモニウムフルオリド（TBAF）処理等も用いられる。上記の脱保護反応は一般に約40℃以下の温度で行なわれるが、好ましくは約25℃以下で行うことにより、保護ペプチド断片のラセミ化異性体の副生を効果的に抑制する
20 ことができる。上記の脱保護反応の反応時間は通常約0.5～約5時間である。

- 上記酸処理においては、例えば、水、トリイソプロピルシラン（TIPS）、フェノール、アニソール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチ
25 オール等（好ましくはフェノール等）のようなカチオン捕捉剤を添加することが好ましい。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,

4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジオール等の存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

本発明により得られた反応生成物は、例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、電気泳動法等の慣用の分離精製手段により、単離精製できる。また、精製する生成物は、最終目的とする修飾されたペプチド又は蛋白質に限らず、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護ペプチド断片、もしくは修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護ペプチド断片、又はこれらの製造工程における中間体として得られた生成物を、上述の分離精製手段により適宜精製することができることは言うまでも無い。

15

以上のようにして、修飾ペプチド又は蛋白質を製造することができる。本発明にかかる上記製造方法は、修飾ペプチド又は蛋白質であれば、特に制限なく適用されうる。中でも、グレリン、好ましくはヒト、ラット、マウス、ブタ、ニワトリ、ウナギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、カエル、ニジマス、もしくはイヌのグレリン、又はグレリン誘導体を製造する際に好適に用いられる。なお、前記各生物のグレリンの構造は、第1表に記載している。本発明により得られるグレリン又はグレリン誘導体は、従来の技術により得られるグレリン又はグレリン誘導体に比べ、不純物（特にグレリン又はグレリン誘導体のラセミ化異性体）の量が大幅に少ない極めて高品質のグレリン又はグレリン誘導体である。その結果、より簡便な精製方法により十分な精製を効果的に行うことができ、作業時間を短縮し、高収率でグレリン又はグレリン誘導

25

体を製造することができる。この点からも従来技術に比べ、本発明の製造方法はグレリン又はグレリン誘導体の工業的製造方法として極めて有利な方法である。

上記「高品質のグレリン又はグレリン誘導体」としてより具体的には、例えば、総類縁物質の含量が約 1 % 以下（好ましくは約 0.9 % 以下、より好ましくは約 0.8 % 以下、更に好ましくは約 0.7 % 以下）である精製グレリン又はグレリン誘導体又はその塩等が挙げられる。ここで、総類縁物質とは、高速液体クロマトグラフィー等により検出される、全ての不純物の合計を意味し、不純物としては、グレリン又はグレリン誘導体のラセミ化異性体、高極性類縁物質、その他の不純物が挙げられる。

本発明にかかる修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法の特に好ましい態様は、以下の通りである。すなわち、

工程 1 ; (a) 配列番号 1 ~ 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、少なくとも N 末端の 1 番目から 4 番目のアミノ酸配列を有し、好ましくは当該アミノ酸配列において N 末端の 1 番目から 5 番目のアミノ酸配列からなるか、又は当該アミノ酸配列において N 末端の 1 番目から 7 番目のアミノ酸配列からなり、(b) N 末端から 3 番目のセリン又はスレオニンの側鎖の水酸基が、アシル化、好ましくは飽和又は不飽和の炭素数 2 ~ 35、好ましくは 6 ~ 18 のアルキル基によりアシル化されており、(c) アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる 1 種以上の、ペプチド断片作製及び下記工程 (4) におけるペプチド断片の縮合反応に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基、好ましくは水酸基及びアミノ基が保護基により保護されているペプチド断片を、弱酸性離脱樹脂上で製造する工程、

工程 (2) ; 弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させるこ

となく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させる工程、

工程（３）；配列番号１～２１のいずれかに記載のアミノ酸配列において、
工程（１）及び（２）で作製されたペプチド断片が有するアミノ酸配列以外
のアミノ酸配列、好ましくは当該アミノ酸配列においてＮ末端の６番目から
5 ２８番目のアミノ酸配列からなるか、又は当該アミノ酸配列においてＮ末端
の８番目から２８番目のアミノ酸配列からなり、かつ、アミノ酸又は非アミ
ノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、
インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる１
種以上の、ペプチド断片作製及び下記工程（４）におけるペプチド断片の縮
10 合反応に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基、
好ましくは水酸基及びアミノ基が保護基により保護されているペプチド断片
を製造する工程、

工程（４）；前記工程（２）で製造されたペプチド断片と工程（３）で製造
されたペプチド断片を縮合し、ついで、所望により反応性官能基の保護基を
15 脱保護する工程
を含む修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法である。

本発明にかかる方法により得られる修飾ペプチド又は蛋白質は、反応条件
により、遊離のペプチド又はその塩の形態で得られる。遊離のペプチドとそ
の塩は、慣用の方法により相互に変換可能である。遊離のペプチドを、薬理
20 的に許容できる塩とする場合には、例えば、次記例示の無機酸、有機酸等と
反応させればよい。上記のペプチド又は蛋白質の塩としては、薬理学的に許
容される塩が好ましく、このような塩としては、該ペプチド又は蛋白質がア
ミノ基等の塩基性基を有する場合、無機酸（無機の遊離酸とも称する）（例、
炭酸、重炭酸、塩酸、硫酸、硝酸、ホウ酸等）、有機酸（有機の遊離酸とも称
25 する）（例、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸等）等との塩
があげられる。該ペプチド又は蛋白質がカルボキシル基等の酸性基を有する

場合、無機塩基（無機の遊離塩基とも称する）（例、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属等）や有機塩基（有機の遊離塩基とも称する）（例、トリエチルアミン等の有機アミン類、アルギニン等の塩基性アミノ酸類等）等との塩があげられる。また、該

5 ペプチド又は蛋白質は金属錯体化合物（例、銅錯体、亜鉛錯体等）を形成していてもよい。

本発明にかかる方法で製造される修飾ペプチド又は蛋白質は、種々の用途に利用することができる。例えば、上記の精製グレリン又はグレリン誘導体は、低毒性であり、哺乳動物（例、ヒト、サル、イヌ、ラット、マウス）に

10 対して、摂食障害治療薬、成長ホルモン分泌促進薬、心疾患治療薬、胃機能性疾患治療剤、腸管粘膜保護剤もしくは経静脈栄養時の小腸粘膜障害予防剤、骨粗鬆症治療剤、慢性疾患による悪液質の減少剤、肺機能不全治療剤等の医薬品として、投与することができる。また、上記の精製グレリン又はグレリン誘導体は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、

15 徐放性製剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤、徐放性製剤等の注射剤；溶液、懸濁液剤等の経鼻投与製剤；噴霧剤もしくは吸入剤等の経肺投与製剤；座剤の形で非経口的に投与できる。上記の精製グレリン又はグレリン誘導体を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、

20 結合剤等とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって上記製剤を製造することができる。

実施例

本発明を以下の実施例で更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本実施例において用いた試験法と機器は、特に記載しない限り以下に記載のものを使用した。

25

〔主な略号〕

- HBTU ; 2 - (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) - 1, 1, 3, 3, -
テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェイト
(2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium
5 hexafluorophosphate) ,
DCC ; ジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide) ,
HOBt ; 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1-hydroxybezotriazole) ,
HOOBt ; 3-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベン
ゾトリアジン (3-hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine) ,
10 TFA ; トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid) ,
TIPS ; トリイソプロピルシラン (triisopropylsilane) ,
DIPEA ; ジイソプロピルエチルアミン (diisopropylethylamine) ,
TBAF ; テトラブチルアンモニウムフルオリド (tetrabutylammonium fluoride) ,
TFE ; トリフルオロエタノール (trifluoroethanol) ,
15 Fmoc ; フルオレニルメトキシカルボニル (fluorenylmethoxycarbonyl) ,
Boc ; *t*-ブチルオキシカルボニル (*t*-butyloxycarbonyl) ,
*t*Bu ; *t*-ブチル (*t*-butyl) ,
TBDMS ; *t*-ブチル ジメチルシリル (*t*-butyl dimethylsilyl) ,
Trt ; トリチル (trityl) ,
20 Pac ; フェナシル (phenacyl) ,
DMF ; N, N-ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylformamide) ,
DCM ; ジクロロメタン (dichloromethane) ,
NMP ; N-メチルピロリドン (N-methylpyrrolidone) ,
Et₂O ; ジエチルエーテル (diethylether) ,
25 DMAP ; 4-ジメチルアミノピリジン (4-dimethylaminopyridine) ,
EDC ; 1-エチル-3 (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド

(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)

〔合成に使用した保護アミノ酸と樹脂〕

- Boc-Gly, Fmoc-Ser (TBDMS), Fmoc-Ser (tBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Leu, Fmoc-Ser,
5 Fmoc-Pro (以上、渡辺化学工業社製又はアプライドバイオシステム社製), プ
ロリル-2-クロロトリチル樹脂 (ノババイオケム社製)。

〔使用機器〕

(a) ペプチド自動合成機

- 10 アプライドバイオシステム社製: 433A合成機

(b) 分析用HPLCシステム

機器: 島津 LC-10A システム

カラム: YMC-Pack PROTEIN-RP 又は YMC-Pack ODS AP-302 又は YMC-Pack
PROTEIN-C8 (全て 4.6 mmφ×150 mm)

- 15 カラム温度: 40 °C

溶出液: 0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を最高100%まで直線
的に変化させた。

流速: 1 mL/分

検出: UV (210 nm 又は 214nm)

- 20 注入量: 10~50 µL

(c) 分取用クロマトシステム

機器1: AKTA explorer 10S (アマシャムファルマシア社製クロマトシステム)

カラム SP-sepharose big beads (XK26/30) (アマシャムファルマシア社製樹
脂)

- 25 内径 26mm x 長さ 300mm

YMC-ODS 120 s50 (HR26/15) (YMC 社製樹脂)

内径 26mm x 長さ 15mm

Vydac C4 (HR10/30) (Vydac 社)

内径 10mm x 長さ 300mm

Source 30RPC (HR10/30) 23 mL (アマシャムファルマシア社製樹脂)

5 内径 10mm x 長さ 30mm

流速、溶出液等の条件は別途実施例に記載した。

機器 2 : Applied Biosystem BioCAD perfusion Chromatography workstation

カラム SP-Toyopearl 550-c (内径 16mm x 280mm TOSOH 社製)

YMC-ODS AM (粒径 20 μ m、内径 21.5mm x 300mm、YMC 社製)

10 逆相クロマトカラム ODS-80Ts

(内径 21.5mm x 300mm カラム (108 mL) 粒径 20 μ m, TOSOH 社製)

流速、溶出液等の条件は別途実施例に示した。

(d) 分取用 HPLC システム

機器 : Waters 600 Multisolvant Delivery System

15 カラム : YMC-Pack ODS-A (5 μ m, 20 mm x 250 mm) 又は YMC-Pack PROTEIN-RP
(5 μ m, C4, 20 mm x 250mm)

溶出液 : 0.1% トリフルオロ酢酸中、適宜アセトニトリル濃度を最高 100% まで
直線的に変化させた。

流速 : 10 mL/分

20 検出 : 210 nm 及び 260 nm

注入 : 10~2000 μ L、2000 μ L 以上はポンプにより注入

(e) 質量分析機

機器 1 : フィニガン MAT TSQ700

イオン源 : ESI

25 検出イオンモード : positive

スプレー電圧 : 4.5kV

キャピラリー温度：250℃

移動相：0.2%酢酸・メタノール混液（1：1）

流速：0.2 mL/分

スキャン範囲：m/z 300～1,500

5 機器2：API3000(宝酒造)

検出イオンモード：positive mode

スキャンタイプ：Q1scan

流速：0.3 mL/分

1 count/0.1msec during 5min chase

10 Molecular range 500～3000 Mass

(f) アミノ酸配列分析

機器：パーキンエルマー社製 アプライドバイオシステム 477A 型シーケンサー

(g) アミノ酸組成分析

15 機器：日立製作所製 L-8500 型アミノ酸分析機計

試料：封管中、0.1%フェノールを含む 6M 塩酸で 110℃、24 時間加水分解した。

[[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] ヒト由来グレリン(8-28)の製造スケールと概要]

以下、実施例 2 から実施例 8 は最終精製品として 0.6 g 程度の
20 [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28) (hGhrelin はヒト由来グレリンを示す。以下も同様である。) とを得ることを目的とした培養及び精製結果である。大腸菌に実施例 1 に示す発現ベクターを形質転換し、同実施例に示すアミノ酸配列を持つ融合蛋白質を発現させた。培養は 2 L 培養槽を用いた高密度培養で行い、封入体を回収した。回収した封入体の半量を用いて精製を開始した。
25 OmpT 反応[0.9 L スケール]、陽イオン交換 SP-sepharose big beads[160 mL スケール]、Boc 化反応[0.5 L スケール]、逆相カラム YMC ODS-120 s50 [80

mL スケール]、Kex2 反応 [0.3 L スケール]はそれぞれ一回ずつ行い、最終精製の逆相カラム Vydac C4 [25 mL スケール]は2回実施した。最終精製工程のみ直線濃度勾配による溶出で分画分析を実施した。また、脱溶媒にはエバポレーターを、濾過にはガラス繊維濾紙（ワットマン社）を用いた減圧濾過を
5 実施した。

実施例 1 hGhrelin(8-28)誘導体発現ベクターp117 8-28oRRの構築

hGhrelin の cDNA 遺伝子配列 (Kojima ら、Nature, 402 巻, p. 656-660, 1999 年) に基づき、全合成オリゴ DNA (ファルマシアバイオテック社)を用いてア
10 ニーリング法により hGhrelin(8-28)の DNA 断片を得た。アニーリングに用いた全合成オリゴ DNA ならびにアミノ酸配列を第 1 図 A に示す。

この DNA 断片を大腸菌 β -ガラクトシダーゼ誘導体とヒト Glucagon like peptide-1 との融合蛋白質遺伝子を導入したプラスミド pGP117ompPR (国際公開番号: WO 00/ 52193)に挿入するため、pGP117ompPR を制限酵素 SalI 及び
15 SacII で処理し、ヒト Glucagon like peptide-1 遺伝子を欠失させた DNA 断片を寒天ゲル電気泳動により調製した。さらにアルカリホスファターゼ処理後、先に SacII 処理、T4 DNA キナーゼ処理を施した hGhrelin(8-28)誘導体遺伝子断片と T4 DNA リガーゼにより連結させた。連結したプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、プラスミド p117 8-28oPR を得た。当該プラスミドは
20 hGhrelin (8-28) のアミノ酸配列と β ガラクトシダーゼの部分断片 117 アミノ酸残基を EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR (配列番号 26) というアミノ酸配列を有するリンカー配列で繋いだ融合蛋白質を発現する。

さらに、このプラスミド p117 8-28oPR を鋳型とし、酵素として KOD plus ポリメラーゼ (東洋紡)、プライマーには以下の2種のプライマー

25 ORI-RR: GGTTCGCGATCCCCCTTCTCGACATCGCCGGAACAC (配列番号 28)

SAL*R : ATAAGTCGACTTATCGTGGCTGCAG (配列番号 29)

を用い PCR を行い増幅断片を電気泳動ゲルから切り出した。さらに、これを制限酵素 SalI、BamHI で処理した。先に p117 8-28oPR を同じく制限酵素 SalI、BamHI 処理し精製したものとこの断片とを T4 DNA リガーゼで連結させ、連結したプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、プラスミド p117 8-28oRR を得た。当該プラスミドは hGhrelin (8-28) のアミノ酸配列と β -ガラクトシダーゼの部分断片 117 アミノ酸残基を EPHHHHPGGRQMhGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHRR (配列番号 27) というアミノ酸配列を有するリンカー配列で繋いだ融合蛋白質を発現する。発現する融合蛋白質を以下第 1 図 B に示す。

10

実施例 2 大腸菌での組換え hGhrelin(8-28)融合蛋白質の発現と封入体回収

実施例 1 で作成したプラスミド p117 8-28oRR を大腸菌 W3110 株に形質転換した大腸菌を用いて 3L 培養槽にて 2L の培養を実施した。なおこの発現プラスミドは pBR322 由来のプラスミドで lac promoter で発現誘導される。また、薬剤耐性遺伝子としてテトラサイクリン耐性遺伝子を保持する。前培養は LB broth にて 32℃ で 14 時間振とう培養した。本培養には以下の組成の培地を使用した。培地組成は 4g/L 酵母エキス、4g/L K_2HPO_4 、4g/L KH_2PO_4 、2.7 g/L Na_2HPO_4 、0.2 g/L NH_4Cl 、1.2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、2g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、40 mg/L $CaCl_2$ 、40 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、10 mg/L $MnSO_4 \cdot nH_2O$ 、10 mg/L $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 、4 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、1 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.5 mg/L H_3BO_4 である。炭素源としてはグルコースを最初培地中に 1 % 添加して、37℃ で培養を開始した。グルコースが枯渇した後、グリセロールを添加して培養を行った。その後培養液を加圧式菌体破砕機 (マントンゴーリン) にて菌体を破砕し、さらに遠心機にて約 80 g の封入体を回収した。さらに、この封入体を脱イオン水 2 L で再懸濁したのち、遠心分離機で回収することで封入体を洗浄した。最終的に OD₆₆₀ 値が 530 である封入体懸濁液 200 mL を得た。

25

以下の実施例はこの封入体懸濁液の半分の量である 100 mL を用いて行った。

実施例 3 hGhrelin(8-28)融合蛋白質の内在性 0mpT プロテアーゼによるプロセッシング

- 5 実施例 2 で得られた封入体懸濁液を OD_{660} の値が 100.0 になるように下記の反応条件に示す添加物と脱イオン水で希釈し、以下の反応条件で 0mpT 反応を実施した。

反応条件：

- 4M 尿素、20mM Tris-HCl pH 7.4、50mM NaCl、反応容量：800 mL、反応温度
10 32℃、反応時間 40 分

- 封入体を $1000D_{660}/\text{mL}$ になるように 8M 尿素 400 mL で溶解希釈し、Tris-HCl、NaCl を上記の濃度になるように添加し、脱イオン水で 800 mL になるようにメスアップする。さらに pH を 7.4 に調整して反応を開始させた。反応開始 0 分、20 分、40 分でサンプリングし HPLC にて分析を行い切断率が 80%を超えた 40
15 分で反応を停止させた。反応停止は 5N NaOH により pH11 まで上昇させて行った。反応停止後、低速遠心により残渣を除去し、上清を得た。

[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)濃度： 2.23 mg/ mL

溶液量： 800 mL

ペプチド含量： 1.7 g

- 20 HPLC 測定結果、及び質量分析の結果、正常にプロセッシングが起きており、[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)が遊離していることが示された。フィニガン MAT 社の質量分析計(TSQ-700)で行った ESI-MS での測定値は 4078(理論値；4077)であった。

- 25 実施例 4 [RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)の精製（陽イオン交換による精製）

実施例 3 で得られた OmpT プロテアーゼ反応液上清を陽イオンクロマトグラフィにより精製を行った。

方法：

使用カラム：SP-sepharose big beads (XK26/30) (160 mL)

5 (アマシャムファルマシア社製樹脂) 内径 26mm x 長さ 300mm

平衡化、洗浄液： 1.5 M 尿素, 50 mM NaHCO₃ pH11

溶出液： 1.5 M 尿素, 0.5 M NaCl, 50 mM NaHCO₃ pH11

初期化、再生液： 0.4M NaOH

流速： 10 mL/min (2.5cm/min)

10 操作：

初期化、平衡化： 0.4M NaOH₂ カラムボリューム → 脱イオン水 2 カラムボリューム → 平衡化液:100% 3 カラムボリューム

サンプル負荷： サンプルを負荷し、平衡化、洗浄液で UV が下がってくるまで洗浄する (約 4 カラムボリューム程度)

15 溶出： 溶出液 100%のステップワイズで実施した。

結果：溶出液で得られたペプチドの純度は 90 %で、工程回収率は 91.6%であった。

[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)濃度：4.75 mg/mL

溶液量： 300 mL

20 ペプチド含量： 1.43 g

実施例 5 [RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)の Boc 化

精製した [RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)に Boc 基の付加反応を行い、N 末端の α アミノ基及び配列中に含まれる Lys 残基の側鎖のアミノ基を Boc 基により保護する。

25

方法:陽イオンクロマト溶出液 300 mL 全量をガラスビーカーに移し、50% ア

セトニトリルになるように等量 (300 mL) のアセトニトリルを加えた。さらに攪拌しながら、1M の (Boc)₂O を [RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)内に存在する α アミノ基とリジン残基側鎖の ϵ アミノ基数 (計 5 箇所) の 5 倍モル量にあたる 8.8 mL (終濃度 20mM, 25 当量) 加えた。さらに pH が 9 を下らないように 5N NaOH で調整し、スターラーで攪拌しながら室温で 60 分間反応させた。

反応効率の測定は HPLC 分析及び分子量の測定によりモニターした。

反応終了後ただちにエバポレーターにより脱溶媒を実施した。脱溶媒後、酢酸にて pH を 5.5 にあわせて沈殿をガラス繊維濾紙 (ワットマン社) にて減圧濾過を行った。この工程により [N ^{α} -Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28) を 1740 mg 含む溶液、580 mL を得た。

工程回収率 : 116% (工程回収率が 100% より大きいのは、Boc 基付加により HPLC での吸光度が上昇し、見かけの回収率が増加したためであると考えられる。)

質量分析はフィニガン MAT 社の質量分析計 (TSQ-700) を使用した。行った ESI-MS での測定値は 4578 (理論値 ; 4577) であった。

Boc 化前 (測定分子量 = 4077、理論上分子量 = 4077) に比べ反応後では分子量が 500 多くなったもの (測定分子量 = 4578、理論上分子量 = 4577) が主に見られた。このピークは hGhrelin(8-28) 配列内のリジン残基側鎖に存在する 4 箇所の ϵ アミノ基、及び N 末端の α アミノ基が Boc 化された [N ^{α} -Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28) であると推定された。

実施例 6 [N ^{α} -Boc, Lys (Boc)^{16, 19, 20, 24}]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28) の逆相カラムによる精製

実施例 5 にて得られた [N ^{α} -Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28) を逆相カラムにて精製した。

方法 :

使用カラム: YMC-ODS 120 s50 (HR26/15) 80 mL (YMC 社製樹脂) 内径 26mm
x 長さ 15mm

平衡化、洗浄液: 10% アセトニトリル, 30 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5

溶出液: 50% アセトニトリル, 30 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5

5 再生液: 80% アセトニトリル

流速: 7 mL/分 (2cm/分)

平衡化液で 3 カラムボリューム平衡化の後、サンプルを負荷し、平衡化液にて 3 カラムボリューム (UV が下がるまで) カラムを洗浄する。溶出は溶出液 100% のステップワイズ溶出で行った。溶出後再生液でカラムを洗浄した。

10 溶出液は 1770 mg の $[N^{\alpha}\text{-Boc, Lys}^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)}$ を含む 150 mL の溶液で得られた。これに限外濾過水を 75 mL 添加することで 1.5 倍希釈し、エバポレーターにて溶液中に含まれるアセトニトリルを留去した。

工程回収率: 98%

15

実施例 7 Kex2 プロテアーゼによる $[Lys^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{-hGhrelin(8-28)}$ の製造

実施例 6 で得られたペプチド溶液を以下に示す条件に調製して Kex2 反応を実施した。すなわち、ODS 溶出液を限外濾過水で 8 mg/mL に希釈後、1M Tris-HCl
20 pH8.3 を 50 mM になるように添加した。さらに 0.25M CaCl_2 を 5 mM になるように添加し、30℃ 10min プレインキュベート後、Kex2 プロテアーゼ (特開平 10-229884) 溶液 (1×10^7 unit/mL) を 2.5×10^4 unit となるように加えて、スターラーで攪拌しながら、30℃ の恒温槽で 120 分間反応させた。反応後、酢酸を用いて pH 5.5 に調整し反応を停止させた。HPLC、質量分析及
25 びアミノ酸分析から、切断前後で原料である $[N^{\alpha}\text{-Boc, Lys}^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)}$ は消失し、

[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)が出現増加していることがわかり、正常にプロセッシングされていることが分かった。

実施例 8 [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28)体の精製

- 5 実施例 7 で得られた [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28) を含む反応後溶液を逆相カラムにて以下の条件で精製した。

方法：

使用逆相カラム Vydac C4 (HR10/30) 23 mL カラム (Vydac 社) 内径 10mm x 長さ 300mm

- 10 条件：

平衡化、洗浄液 10%アセトニトリル, 0.1% TFA pH 3

溶出液： 50% アセトニトリル, 0.1% TFA pH 3

流速：2 mL/分 (線流速 3cm/分)

- 15 3 カラムボリューム平衡化液を流した後、Kex2 反応後溶液を 2 回に分けて負荷 (20 mg/mL 樹脂) し、溶出液 10% で 2 カラムボリューム洗浄した後、溶出液 10% ~ 80% の直線濃度勾配を 8 カラムボリュームで終了するプログラムで溶出させ、続いて溶出液 100% で 2 カラムボリューム洗浄し、この間の溶出液を 6 mL ずつフラクション分取した。フラクションは HPLC 分析し、リンカー [N^α-Boc]-[RHHGSGSPSRHRR] 及び、未切断体 [N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]- hGhrelin(8-28) を含まないフラクションをプールした。
- 20

結果：

収率：84.4% 純度 97.5%

[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) 濃度：5.62 mg/ mL

溶液量： 120 mL

- 25 ペプチド含量： 600 mg

溶出した溶液をエバポレーターにて脱溶媒を行った後、凍結乾燥を実施し、OmpT プロテアーゼ誘導体によるプロセッシングで得られた 1700 mg の前駆体（実施例 3）より、 $[\text{Lys}^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{hGhrelin}(8-28)$ を 600 mg 得た（第 2 図）。

実施例 9 $[\text{Lys}^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{hGhrelin}(8-28)$ 体の精製回収率、純度表

- 5 以下に実施例 3 から実施例 8 で示した $[\text{Lys}^{16, 19, 20, 24}(\text{Boc})]\text{hGhrelin}(8-28)$ の製造収率一覧表を第 2 表に示す。

第 2 表

表 2 実施例 3 から実施例 8 で示した [Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]hGhrelin (8-28) の製造収率一覧表

工程	Pre 8-28 * (mg/ mL)	Boc-Pre8-28 ** (mg/ mL)	Boc-8-28 *** (mg/ mL)	液量 (L)	Boc-8-28 量 *** (g)	単位工程 収率 (%)	収率 (%)	純度 (%)
0mp-T 反応	2.23	2.51	1.68	0.8	1.3	-	100.0	
遠心分離後	1.97	2.21	1.48	0.8	1.2	91.6	91.6	90
陽イオンクロマト後	4.75	5.33	3.58	0.3	1.1	87.1	79.8	95
Boc 化後	-	3.11	2.08	0.6	1.3	116.6	93.0	92
逆相 (YMC) 濃縮後	-	12.59	8.44	0.2	1.4	98.0	91.2	95
Kex2 反応後	-	-	2.45	0.2	0.8	55.2	50.6	
逆相 (Vydac) 濃縮後	-	-	5.62	0.12	0.6	84.4	42.1	98

Pre 8-28*は[RHGGSPSRHRR]-hGhrelin (8-28) を意味する。

Boc-Pre8-28**は[N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHGGSPSRHRR]-hGhrelin (8-28) を意味する。

Boc-8-28***は[Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)] hGhrelin (8-28) を意味する。

実施例 10

(10-1) N末端側断片 ($[N^{\alpha}$ -Boc, Ser^{2,6}(tBu)]hGhrelin(1-7)) の合成 (方法1)

- 5 プロリル-2-クロロトリチル樹脂 (ノババイオケム社製、1.39 g、1.0 mmol) をガラスフィルター付き反応容器に入れ、順次 HBTU による Fmoc-アミノ酸の導入とピペリジンによる脱 Fmoc を繰り返し、N 末端残基に Boc-Gly を導入して、Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-クロロトリチル樹脂を構築した。得られた保護ペプチド樹脂を 0.1 M TBAF/DMF 溶液 (50 mL) で 30 分間処理した。ペプチド樹脂を濾取し、DMF (30 mL) で数回洗浄した後、
- 10 イソプロピルアルコール、次いで DCM (30 mL) で洗浄した。次に、得られた脱 TBDMS ペプチド樹脂を NMP (5 mL) に膨潤させ、DMAP (374 mg, 3.1 mmol) 存在下、オクタン酸 (588 mg, 4.1 mmol)、EDC·HCl (848 mg, 4.4 mmol) を加え 16 時間反応させた。樹脂を濾取し、NMP、イソプロピルアルコール、DCM で順次洗浄し、減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂を得た。このものに、0.5% TFA/DCM 溶液 30 mL を加え、室温
- 15 で 30 分間攪拌し、保護ペプチドを樹脂から離脱させた。樹脂を濾去し、濾液を濃縮後、残渣に水を加え沈殿とした。沈殿を濾取した後、さらにヘキサン中で攪拌して洗浄し、再度濾取した。これを終夜、減圧して乾燥し、目的物 742 mg (収率 72%) を得た。HPLC によりこのものの純度を調べたところ、94%
- 20 であった。

(10-2) N末端側断片 ($[N^{\alpha}$ -Boc, Ser^{2,6}(tBu)]hGhrelin(1-7)) の合成 (方法2)

- 25 プロリル-2-クロロトリチル樹脂 (ノババイオケム社製、1.95 g、1.0 mmol) をガラスフィルター付き反応容器に入れ、順次 HBTU による Fmoc-アミノ酸の導入とピペリジンによる脱 Fmoc を繰り返し、Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-クロ

ロトリチル樹脂を構築した。次に HOOBt/DCC により Fmoc-Ser-OH を導入し、次いで脱 Fmoc と HOOBt/DCC による縮合を繰り返し、N 末端残基に Boc-Gly を導入して、Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-クロロトリチル樹脂を構築した。得られたペプチド樹脂を NMP (5 mL) に膨潤させ、DMAP (374
5 mg, 3.1 mmol) 存在下、オクタン酸 (579 mg, 4.0 mmol)、EDC・HCl (847 mg, 4.4 mmol) を加え 16 時間反応させた。樹脂を濾取し、NMP、イソプロピルアルコール、DCM で順次洗浄し、減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂を得た。このものに、0.5% TFA/DCM 溶液 30 mL を加え、室温で 30 分間攪拌し、保護ペプチドを樹脂から離脱させた。樹脂を
10 濾去し、濾液を濃縮後、残査に水を加え沈殿とした。沈殿を濾取した後、さらにヘキサン中で攪拌して洗浄し、再度濾取した。これを終夜、減圧して乾燥し、目的物 715 mg (収率 69%) を得た。HPLC によりこのものの純度を調べたところ、74%であった。

15 実施例 11 断片縮合と脱保護

それぞれ実施例 10-1 と実施例 8 で得られた [N^{α} -Boc, Ser(tBu)^{2,6}]hGhrelin(1-7) 及び [Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28) を、あらかじめアミノ酸分析計を用い定量したのち、縮合反応に供した。[N^{α} -Boc, Ser(tBu)^{2,6}]hGhrelin(1-7)、HBTU、DIPEA それぞれ 0.19 mmol を DMF 1 mL に
20 溶解し、30 分間室温で攪拌した。その後、[Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28) を 0.16 mmol 及び DIPEA 0.48 mmol を DMF 1.5 mL に溶解し、攪拌下、前述の活性化 N 末端側断片溶液を滴下した。1 時間後、反応溶媒を減圧留去し、残査に Et₂O を加え析出させ、洗浄後、乾燥した。得られた粉末に TFA 6 mL を加え、30 分間室温でゆるやかに攪拌した。TFA を減圧留去し、残査に Et₂O を加え析出させ、洗浄、乾燥を経て、白色粉末状の粗ペプチド 0.70 g を得た。こ
25 のものを分析用 HPLC で分析した結果、チャート上の目的物純度は 80% であり、

また全化学合成品と保持時間が一致した。さらに半合成品及び全化学合成品をコインジェクションしたところクロマト上ピークが一致した。縮合前後の HPLC チャートを第 3 図に示す。

5 実施例 1 2 hGhrelin の精製

実施例 1 1 で得られた白色粉末状の粗ペプチド 0.70 g を 5% 酢酸で 7 mg/mL に溶解し、以下の条件で精製を実施した。

方法、条件；

使用カラム：Source 30RPC (HR10/30) 23 mL カラム

10 (アマシャムファルマシア社製樹脂) 内径 10mm x 長さ 30mm

平衡化、洗浄液：10% アセトニトリル, 50mM 酢酸

溶出液：60% アセトニトリル, 50mM 酢酸

再生液：80% アセトニトリル

流速：2.5 mL/分 (2cm/分)

15 平衡化液で 3 カラムボリューム平衡化の後、hGhrelin 溶解液を 2 分し、半量ずつを負荷し、平衡化液にて 3 カラムボリューム (UV が下がるまで) カラムを洗浄する。溶出は溶出液 0 % から 100 % までの直線濃度勾配を 6 カラムボリュームで終了するプログラムで溶出させた。溶出液は 5 mL ずつフラクション分画し、適時 HPLC で分析し、hGhrelin を含むフラクションをプールした。

20 た。プールはエバポレーターで脱溶媒した後、凍結乾燥を実施した。結果、純度 98% の hGhrelin を 512 mg (回収率 73%) 得た。精製 hGhrelin の HPLC での分析結果を第 4 図に示す。

以下の実施例 1 3 から 1 5 までは、上記の実施例 1 から 1 2 までに示した

25 条件の最適化に関するものである。したがって、本発明が下記条件に限定されないことは言うまでもない。

実施例 13 融合蛋白質の配列の違いによる Kex2 の切断効率の違い

Kex2 の切断効率はその基質の認識配列により大きく異なる。その切断効率は *in vivo* で Kex2 切断配列 KR(10)>>RR(5)>>TR(1.2) >PR(1.0) [() 内は PR を 1 とした際の切断効率] の順で切れにくくなる (Proc. Natl. Acad. Sci 95
5 p10384-10389 1998) ことが報告されている。

以下第 5 図に実施例 1 で作成した p117s 8-28oPR、p117 8-28 oRR とさらに、p117 8-28oPR を鋳型にして PCR で作成したプラスミド p117 8-28oKR が発現する蛋白質を示す。

これら 3 種類の蛋白質を発現するプラスミドを保持する大腸菌 W3110 を用
10 いてそれぞれ培養を実施し、実施例 2 から 6 に示した方法の約 10 分の 1 のスケールで精製を行い、それぞれ [N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHPR]-hGhrelin(8-28) (以下 PR-hGhrelin(8-28))、[N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28) (以下 RR-hGhrelin(8-28))、[N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24} (Boc)]-[RHHGSGSPSRHKR]-hGhrelin(8-28) (以下
15 KR-hGhrelin(8-28)) の 3 種類のペプチドを調製した。

調製したペプチドについて、実施例 7 で示した方法を用いて Kex2 プロテアーゼ処理を実施した。反応開始 60 分の HPLC の分析プロファイルを第 6 図に示す。

第 6 図に示すように切断率の順番では RR-hGhrelin(8-28) >
20 PR-hGhrelin(8-28) > KR-hGhrelin(8-28) で RR-hGhrelin(8-28) が一番切断率が高かった。また KR-hGhrelin(8-28) については Boc 基が KR のリジン残基を保護してしまい、リジンの電荷を消失させることになるため、切断がまったく起きなかった。また PR-hGhrelin(8-28) は切断効率が低く、hGhrelin(8-28) 内で切断が生じた。この hGhrelin(8-28) 内での分解は hGhrelin のアミノ酸番号 15 のアルギニンと 16 のリジンの間で切断が生じていた。
25

実施例 1 4 大腸菌の培養に適した融合蛋白質の構築

培養に適した融合蛋白質を得るため、実施例 1 3 第 5 図で示した融合蛋白質以外にも以下第 7 図に示すような融合蛋白質を発現するプラスミドを作成した。第 7 図に示すいずれの融合蛋白質とも p117 8-28oPR を鋳型にしてそれぞれ異なるプライマーから PCR で作成した。p117 8-28oRR に対して、蛋白質の等電点の低下を目的として変異体を構築した。

作成した融合蛋白質プラスミドをそれぞれ大腸菌 W3110 株に形質転換した大腸菌を用いて 3L 培養槽にて 2L の培養を実施した。前培養は LB broth にて 32℃で 14 時間振とう培養した。本培養の培地組成は実施例 2 で示したものと同一である。炭素源としてはグルコースを最初培地中に 1%添加して、32℃で培養を開始した。グルコースの枯渇後、グリセロールを添加して培養を行った。またグルコースの枯渇時に培養温度を 37℃に上昇させ、培養後は加圧式菌体破砕機（マントンゴーリン）にて菌体を破砕した。培養の成果については最終濁度と菌体破砕時の濁度で判断した。菌体の濁度及び、菌体破砕前後の濁度の比が高いものほど封入体の生産性が高い菌と判断した。結果を第 8 図のグラフ A, B に示す。

グラフ A, B から分かるように最終濁度、菌体破砕後の濁度比率から、構築した融合蛋白質の中で 117 8-28oRR 融合蛋白質がもっとも高い生産性を示した。実施例 1 3、1 4 の結果から実施例 2 では当該蛋白質を発現するプラスミド p117 8-28oRR が培養にも適していると考えられた。

実施例 1 5 [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)の安定性

実施例 6、7、8 において、[N^α-Boc, Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]-[RHHGSGSPSRHRR]-hGhrelin(8-28)及び[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)において 1~10%程度 Boc 基が脱離するという現象が認められた。[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)は付加した Boc 基が一箇所でも脱離すると、その後の縮合工

程で大幅な縮合率低下につながるため、Boc 基の脱離を防ぐ目的で [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)の安定性を調べた。

分解に影響を及ぼすパラメータとしては保存中の pH と保存温度が考えられた。そこで以下のような条件での安定性を HPLC により分析し、評価した。

- 5 方法：新たに精製した [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)を 30mM 酢酸ナトリウム溶液に溶解し、pH 2, 3, 4 は TFA をもちいて、pH 6, 7, 8 は 5N NaOH を用いて pH を調整し、さらに、4℃、20℃、37℃、42℃の恒温槽で 1 週間放置した。放置開始後、0 時間、2 時間、6 時間、9 時間、24 時間、48 時間、96 時間、168 時間でサンプリングを行い、HPLC にて分析を実施した。解析方法としては HPLC での分析結果の総ピーク面積に対する [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28)のピーク面積の割合 (%) を経時的に評価
- 10 することで行った。

- 結果：以下第 9 図及び第 10 図に保存温度毎にまとめたグラフを 4 種類示す。pH が低いほど (pH3 以下)、温度が高いほど、分解物が増加することがわかった。また pH4 以上であれば、42℃でも安定であることがわかった。よって pH をコントロールすることが、この分解物生成の抑制に重要であることが判明した。
- 15

実施例 16 hGhrelin (1-28)の製造 (方法 2)

- 20 (1) hGhrelin (8-28)誘導体発現ベクター p117-8-28ok の構築

- 実施例 1 と同一の方法で、プラスミド p117-8-28ok を得た。実施例 1 で作成したプラスミド p117 8-28oPR とプラスミド p117-8-28ok の相違は、前者のリンカー配列が EPHHHHPGGRQMHGYDADVRLYRRHHGSGSPSRHPR (配列番号 26) であるのに対し、後者のリンカー配列は RRHHGSGSPSRHPR (配列番号 35) である点のみである。
- 25

(2) 大腸菌での組換え hGhrelin(8-28) 融合蛋白質の発現

hGhrelin(8-28) 融合蛋白質発現プラスミド p117-8-28ok を大腸菌 W3110 株に形質転換し、形質転換株を得た。この株をグルコース及びグリセロールを炭素源とする 20 L の培地で培養を行い、最終 OD₆₆₀ 値が 54 の培養液を得た。

5

(3) hGhrelin(8-28) 融合蛋白質の内在性 OmpT プロテアーゼによるプロセッシング

前記(2)で得られた培養液より菌体(約 680 g)を TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) バッファー 20 L に懸濁後、高圧ホモジナイザーを用いて菌体の
10 破碎処理を 2 回行った。その後、遠心分離で封入体を回収し、脱イオン水で再度懸濁し、遠心分離することで封入体を洗浄した。次に遠心分離により得られた封入体ペレット(湿重量約 170 g)を少量の脱イオン水で懸濁し、OD₆₆₀ 値が 826 の封入体濃縮液 550 mL を得た。550 mL の封入体濃縮液より 50 mL を採取後、OD₆₆₀ の値が 50.0 になるように脱イオン水で希釈し、Tris-HCl
15 (pH8.2)、EDTA(pH8.0)をそれぞれ終濃度 50mM、1mM になるように加え、尿素(終濃度 4.0M)により封入体を溶解させた。尿素により封入体を溶解することで、内在性の OmpT プロテアーゼにより融合蛋白質のリンカー配列 RRHGSGPSRHPR (配列番号 35) の Arg-Arg 間を切断させた。即ち、反応溶液を 30℃で 5 分保温後、30℃で 15 分 OmpT プロテアーゼ処理を行った。その
20 後 3%AcOH を添加して反応を停止させた。本処理により、RRHGSGPSRHPR-hGhrelin(8-28)を 1.3 g 得た。ESI-MS 4019 (理論値; 4018)

hGhrelin(8-28) 融合蛋白質の内在性 OmpT プロテアーゼによるプロセッシング工程の高速液体クロマトグラフィーによる解析の結果、RRHGSGPSRHPR-hGhrelin(8-28)が遊離していることが示された。

25

(4) RRHGSGPSRHPR-hGhrelin(8-28) の精製 (陽イオン交換による精製)

前記(3)で得られた OmpT プロテアーゼ反応液(900 mL)を、平衡化液(1.5M Urea, 20mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.3)にて平衡化させた陽イオン交換カラム SP-Toyopearl 550-c (bed volume 55 mL, 16mmID x 280mm TOSOH 社製)に4回に分けて負荷した。各回、平衡化液で十分カラムを洗浄後、平衡化液 75%、
5 溶出液(1.5M Urea, 1.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH8.3) 25%から溶出液 100%の濃度勾配を 1.5 カラムボリュームで完了するプログラムで溶出を行った。5 mL 毎にサンプリングを行い、各分画を高速液体クロマトグラフィーで分析し、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ誘導体の含まないピークを分取した。4回分の合計収量は約 950 mg であった。

- 10 上記精製溶出液(660 mL)を2等分し、2%アセトニトリル、0.1%TFAで平衡化した YMC-ODS AM(粒径 20 μ m, YMC 社製) 21.5mmID x 300mm カラムに2回負荷した。平衡化液で十分洗った後、溶出液[50%アセトニトリル、0.095%TFA]で溶出を行った。溶出ピークを分取後、溶出液中に含まれるアセトニトリルはロータリーエバポレーターにて除去し、RHHGSGSPSRHPR-hGhrelin(8-28)を
15 720 mg 含む溶液 220 mL を得た。(3)、(4)で用いた高速液体クロマトグラフィーの条件を以下に示す。

カラム; YMC ODS AP-302、検出器; Hitachi 高速液体クロマトグラフィーシステム(D7000)、流速; 1 mL/min、溶出; バッファーA[1.0%アセトニトリル、0.1%TFA] 100%からバッファーB[50.0%アセトニトリル、0.1%TFA] 100%
20 の20分間直線濃度勾配。

(5) RHHGSGSPSRHPR-hGhrelin(8-28)の t-ブトキシカルボニル(Boc)化

- 前記(4)で得られた試料 220 mL (RHHGSGSPSRHPR-hGhrelin(8-28)を 720 mg 含む)をガラス三角フラスコに移し、等量のアセトニトリル(220 mL)を加えた。これに 1M の二炭酸ジ-t-ブチルを RHHGSGSPSRHPR-hGhrelin(8-28)内に存在する α アミノ基と L y s ϵ アミノ基数(計5箇所)の5倍モル量にあたる
25

4.4 mL (終濃度 10mM, 25 当量) 加えた。さらにトリエチルアミンにて pH9 に調整し、スターラーで攪拌しながら室温で 60 分反応させた。反応の停止は酢酸を終濃度 0.5% になるように添加し、pH を中性付近にした後、速やかにロータリーエバポレーターによりアセトニトリルを除去し、

- 5 Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) を 530 mg 含む溶液、300 mL を得た。ESI-MS; 4519 (理論値; 4518)。

Boc 化前後の RHHGSGSPSRHPR-hGhrelin(8-28) の溶出プロファイル、及びマ
ススペクトロメトリー測定結から、Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]
hGhrelin(8-28) の生成を確認した。本反応のモニターには以下のクロマトシ
10 ステムを使用した。カラム; YMC-C8、検出器; Hitachi 高速液体クロマトグラ
フィーシステム (D7000)、流速; 1 mL/min、溶出; バッファーA [1.0%アセ
トニトリル、0.1%TFA] 100%からバッファーB [60.0% アセトニトリル、0.095%
TFA] 100%の 20 分間の直線濃度勾配。

- 15 (6) Kex2 プロテアーゼによる [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]hGhrelin(8-28) の製造
前記 (5) で得られた Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]
hGhrelin(8-28) を逆相カラムにて精製した。2%アセトニトリル、0.1%TFA、10mM
酢酸ナトリウム、pH4.5 で平衡化した YMC-ODS AM(粒径 20 μ m、TOSOH 社
製) 21.5mmID x 300mm カラムに上記 Boc 誘導体 (約 500 mg) を負荷した。平
20 衡化液で十分洗った後、溶出液 [70%アセトニトリル、0.095%TFA、10mM 酢酸
ナトリウム、pH4.5] で溶出した。Boc-RHHGSGSPSRHPR-[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]
hGhrelin(8-28) (420 mg) を含む溶出ピークを分取後、アセトニトリルをエ
バポレーターにて除去した。本溶液に 250mM 塩化カルシウム溶液、1M Tris-HCl
pH8.2 をそれぞれ終濃度 5mM、50mM になるように添加した。30℃、5 分間保温
25 後、Kex2 プロテアーゼ (特開平 10-229884) 溶液 (1x10⁷ unit/mL) を
3x10⁴ unit/mL になるように添加し、30℃、45 分間反応した。

本工程の高速液体クロマトグラフィーによる解析の結果、linker 配列 RHHGSGSPSRHPR と [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) とが切断されていることが示された。

5 (7) [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28)体の精製

前記(6)で得られた[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) (320 mg)を含む反応後溶液(300 mL)を酢酸で pH3.5 に調整後、10%アセトニトリル、0.095%TFA で平衡化した逆相クロマトカラム ODS-80Ts (21.5mmID x 300mm カラム(108 mL) 粒径 20um, TOSOH 社製)に負荷した。平衡化液で 2 カラムボリューム洗浄後、
10 バッファーA [10%アセトニトリル、0.095%TFA] 70%、バッファーB [65%アセトニトリル、0.1%TFA] 30%からバッファーB 100%の濃度勾配を 5 カラムボリュームにて完了するプログラムを行い、[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28)体を溶出させた。フラクション(5 mL ずつ)を分取し、高速液体クロマトグラフィー(条件は(6)と同様である)にて分析を行った。[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)]
15 hGhrelin(8-28)の溶出画分を集め。濃縮後、凍結乾燥し、136 mg の [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28)体を得た。OmpT プロテアーゼ誘導体によるプロセッシングで得られた 1300 mg の前駆体(前記(3))より 136 mg の [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28)体最終標品を得た。

20 (8-1) N末側断片([N^α-Boc, Ser^{2, 6}(tBu)] Ghrelin(1-7)の合成 (方法1)

プロリル-2-クロロトリチル樹脂(ノババイオケム社製、548 mg、0.25 mmol)上に、ペプチド自動合成機を用いて、順次 HBTU による Fmoc-アミノ酸の導入とピペリジンによる脱 Fmoc を繰り返し、N 末端残基に Boc-Gly を導入して、
Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-クロロトリチル樹脂
25 脂を構築した。得られた保護ペプチド樹脂(757 mg)を 0.1 M TBAF/DMF 溶液(5 mL)で 1 時間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、DMF(10 mL)で数回洗

- 浄した後、イソプロピルアルコール、ついで塩化メチレン(10 mL)で洗浄した。次に、得られた脱 TBDMS ペプチド樹脂を DMF (10 mL) に膨潤させ、DMAP (31 mg, 0.25 mmol) 存在下、オクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol)、EDC・HC l (211 mg, 1.1 mmol) を加え 16 時間反応させた。樹脂をろ取し、DMF、イソプロピルアルコール、塩化メチレンで順次洗浄し、減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂を得た。このものに、酢酸 2 mL / TFE 2 mL / 塩化メチレン 6 mL の混合溶液を加え、室温で 1 時間攪拌し、保護ペプチドを樹脂から離脱させた。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残渣にエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド 248 mg (収率 96%) を得た。本品を酢酸水及びアセトニトリルの混液約 2 mL に溶解し、YMC-Pack ODS-A (20 mm x 250mm に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 40% から 80% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、210 mg の目的物を得た。
- 15 (8-2) N 末側断片 ($[N^{\alpha}\text{-Boc, Ser}^{2,6}(\text{tBu})]$ Ghrelin(1-7) の合成 (方法 2)
- プロリル-2-クロロトリチル樹脂 (ノババイオケム社製、466 mg, 0.25 mmol) 上に、ペプチド自動合成機を用いて、順次 HBTU による Fmoc-アミノ酸の導入とピペリジンによる脱 Fmoc を繰り返し、N 末端残基に Boc-Gly を導入して、Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2-クロロトリチル樹脂を構築した。この樹脂を 1% TFA, 5% TIPS / ジクロロメタンで 30 min 処理することにより、Trt 基の除去及び樹脂からの切断を同時に行った。樹脂をろ去した後、ジクロロメタンを減圧留去して濃縮し、これに Et₂O を加えて析出させ乾燥したところ、白色沈殿として Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OH を 165 mg 得た。次に、臭化
- 20 フェナシル (Phenacyl Bromide, 40 mg, 1.1 当量)、トリエチルアミン (20 mg, 1.1 当量) を加え、DMF 約 3 mL 中で 2 hr 反応させた。反応後、反応溶液を約
- 25

5 倍量の酢酸エチル中に入れ、水及び飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、これをろ去した後濃縮し、Et₂O で析出させ乾燥したところ、白色沈殿として Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OPac を得た。次に、オクタン酸 (18.2 mg、1.1 当量)、EDC・HCl (26.4 mg、1.2 当量)、

5 DMAP (1.4 mg、0.1 当量) を加え、DMF 約 2 mL 中で終夜反応させた。、反応溶液を約 5 倍量の酢酸エチル中に入れ、水及び飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、これをろ去した後濃縮、Et₂O で析出させ乾燥し、白色沈殿として Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Octanoyl)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OPac を 144 mg 得た。次に、酢酸 1.5 mL、亜鉛末 (Zinc Powder、163 mg、20 当量)

10 を加え 1 hr 反応させた後、ろ過し、冷水を加え析出させ、Et₂O で洗浄し乾燥した。白色沈殿として Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(Octanoyl)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OH を 65 mg 得た。本品を酢酸水及びアセトニトリルの混液約 2 mL に溶解し、YMC-Pack ODS-A (20 mm x 250mm に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 40% から 80% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min)

15 で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥して目的物 50 mg を得た。

(9) 断片縮合と脱保護

それぞれ前記 (8-1) と前記 (7) で得られた [N^{α} -Boc, Ser(tBu)^{2, 6}]-Ghrelin(1-7) 及び [Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) を、あらかじめアミノ

20 酸分析計を用い定量したのち、縮合反応に供した。[N^{α} -Boc, Ser(tBu)^{2, 6}]-Ghrelin(1-7) を 19.3 μ mol、HBTU 20.3 μ mol 及び DIPEA 20.3 μ mol を DMF 500 μ L に溶解し、1 時間室温で攪拌した。その後、[Lys^{16, 19, 20, 24}(Boc)] hGhrelin(8-28) を 18.4 μ mol 及び DIPEA 55.2 μ mol を DMF 1 mL に溶解し、攪拌下、前述の活性化 N 末側断片溶液を滴下した。3 時間後、反応溶媒を減圧

25 留去し、残渣に Et₂O を加え析出させ、洗浄後、乾燥した。えられた粉末に TFA 3 mL を加え、30 min 室温でゆるやかに攪拌した。TFA を減圧留去し、残渣に

Et₂O を加え析出させ、洗浄、乾燥を経て、白色粉末状の粗ペプチド 77 mg を得た。このものを分析用 HPLC で分析した結果、チャート上の目的物純度は 83% であり、また化学合成品と保持時間が一致した。さらに半合成品及び全合成品をコインジェクションしたところクロマト上ピークが一致した。

5

(10) hGhrelin(1-28)体の精製

前記(9)で得られた白色粉末状の粗hGhrelin 67 mgを1%酢酸で1 mg/mLに溶解し、0.1 M酢酸で平衡化した逆相クロマトカラムTSK-ODS-80Ts 108 mL (ID21.5 mm x 300 mm) に負荷した。平衡化液で2カラムボリューム洗浄後、
10 バッファーA [0.1M酢酸] 100%からバッファーB [40%アセトニトリル、0.1M酢酸]100%の濃度勾配を5カラムボリュームにて完了するプログラムを行い、hGhrelin(1-28)体を溶出させた。高純度の画分を集め、凍結乾燥して、hGhrelin(1-28) 34.4 mgを得た。

ESI-MS 3371 (理論値 3370.86)、6N 塩酸化水分解後のアミノ酸組成比 Ala ;
15 1.01 (1) , Arg ; 2.97 (3) , Glx ; 5.95 (6) , Gly ; 1.02 (1) , His ;
1.00 (1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 4.01 (4) , Phe ; 1.00 (1) , Pro ;
4.01 (4) , Ser ; 3.60 (4) , Val ; 1.00 (1) (括弧内は理論値)、Ca mobilization 活性 1.3 nM (ref.1.5 nM)

20 実施例 17 Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-OHの脱 TBDMS条件とオクタノイル化条件の最適化

実施例 16 (8-1)の方法に従って、3位セリン TBDMS 基の除去反応及びオクタノイル化反応の最適条件について検討した。プロリル-2-クロロトリチル樹脂上に、ペプチド自動合成機 (アプライドバイオシステムジャパン(株)
25 製、433A) を用いて、順次 HBTU による Fmoc-アミノ酸の導入とピペリジンによる脱 Fmoc を繰り返し、N 末端残基は Boc-Gly を導入することにより、

Boc-Gly-Ser(tBu)-Ser(TBDMS)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-2 クロロトリチル樹脂を構築した。次に、樹脂を 0.05 mmol (約 150 mg) ずつに分け、第 3 表及び第 4 表に示す条件でオクタノイル化を行った。樹脂の洗浄、樹脂からのペプチド切断等の条件は、実施例 16 (8-1) と同様に行った。

- 5 その結果、TBDMS 基の除去反応は 0.1 M TBAF 溶液を用いて 30 分間から 1 時間反応させることが好ましく、またオクタノイル化反応はオクタン酸 4 当量、EDC 4.4 当量、DMAP 1 当量を用いて 8~16 時間反応させることが好ましいことが明らかになった。

第3表

TBDMS 基の除去反応^a

	TBAF (M)	反応時間 (時間)	収率 ^b (%)	目的物純度 ^c (%)	比率 ^c	
					オクタノイル： デスオクタノイル	
I	0.01	0.25	89	94	98.3	: 1.7
II	0.01	3	100	97	100	: N.D. ^d
III	0.1	0.25	94	97	100	: N.D.
IV	0.1	0.5	100	96	100	: N.D.
V	0.1	1	98	96	100	: N.D.
VI	0.1	3	100	96	100	: N.D.

- a ; TBDMS基の除去率は、TBAF処理したペプチド樹脂をオクタノイル化したのち、脱保護して得られるオクタノイル体とTBDMS未除去を示すデスオクタノイル体との比で求めた。オクタノイル化は、オクタン酸4当量、EDC 4.4当量、DMAP 1当量を用い、24時間反応。

b ; プロリル-2-クロロトリチル樹脂の置換率を基準に算出。

c ; 目的物純度及び比率は、分析用HPLCにより算出。

d ; N.D. 検出されず。

第4表

3位セリンのオクタノイル化反応^a

	オクタン 酸 (当量)	EDC (当量)	DMAP (当量)	反応 時間 (時間)	収率 ^b (%)	目的物 純度 ^c (%)	比率 ^c	
							オクタノイル:	デスオクタノイル
VII	4	4.4	0.1	24	83	94	97.2	: 2.8
VIII	2	2.2	1	24	93	96	99.5	: 0.5
IX	4	4.4	1	1	85	78	80.5	: 19.5
X	4	4.4	1	4	98	97	99.7	: 0.3
XI	4	4.4	1	8	98	96	100	: N.D. ^d
XII	4	4.4	1	16	97	98	100	: N.D.

a ; 全てのサンプルは0.1 M TBAFで1時間処理して、TBDMS基を除去した。

b ; プロリルー2-クロロトリチル樹脂の置換率を基準に算出。

5 c ; 目的物純度及び比率は、分析用HPLCにより算出。

d ; N.D. 検出されず。

実施例18 断片縮合条件の検討

- 10 [N^α-Boc, Ser(tBu)^{2,6}]hGhrelin(1-7)と[Lys^{16,19,20,24}(Boc)]hGhrelin(8-28)を用い、種々の縮合試薬の反応効率を検討したところ、HBTUがもっとも良い結果を与えたが、EDC/HOBt、EDC/HOSu、DPPAでも反応が進行することが明らかになった。

第5表

[N^α-Boc, Ser(tBu)^{2, 6}]-Ghrelin(1-7)+hGhrelin(8-28)

縮合剤	反応時間	目的物純度 (HPLCより算出)
HBTU	5 時間	83 %
EDC/HOBt	1 6 時間	74 %
EDC/HOSu	1 6 時間	40 %
DPPA	2 4 時間	19 %

産業上の利用可能性

- 5 本発明の製造方法により、非常に高品質の修飾ペプチド又は蛋白質を高収量で得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有し、そのうち少なくとも1のアミノ酸又は非アミノ酸が式1； $-A(R)-$ （式中、Aはアミノ酸又は非アミノ酸を示し、RはAの側鎖に結合している修飾のために導入された置換基を示す。）で表わされる修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸であり、かつ、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基が保護基により保護されているペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上で作製し、ついで、弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させることなく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱することを特徴とする、修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片の製造方法。

2. (a) アミノ酸又は／及び非アミノ酸からなる所望の配列を有し、かつアミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、ペプチド断片作製に際して望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基が保護基により保護されているペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上で作製し、(b) 前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂上から離脱させることなく、置換基Rにより修飾をうけるアミノ酸又は非アミノ酸Aの側鎖における反応性官能基に保護基が導入されている場合は、当該保護基を脱保護し、(c) 前記脱保護した側鎖を置換基Rで修飾し、(d) 弱酸性条件で前記ペプチド断片における保護基を脱離させることなく前記ペプチド断片を弱酸性離脱樹脂から離脱させることを特徴とする請求

の範囲第 1 項に記載のペプチド断片の製造方法。

3. 置換基 R により修飾を受けるアミノ酸又は非アミノ酸 A の側鎖における反応性官能基の保護基が、シリル系保護基であり、前記保護基の脱保護
5 にフッ化四級アンモニウムを用いることからなる請求の範囲第 2 項に記載のペプチド断片の製造方法。

4. シリル系保護基が、t-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、t-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、トリイソプロピルシリル (TIPS)、トリイソ
10 ブチルシリル (TIBS)、t-ヘキシルジメチルシリル (ThxTMS) 又はトリフェニルシリル (TPS) であり、フッ化四級アンモニウムがテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF)、テトラエチルアンモニウムフルオリド (TEF) 又はアンモニウムフルオリドである請求の範囲第 3 項に記載のペプチド断片の製造方法。

15

5. A がセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、リジン、オルニチン、グルタミン酸、2-アミノアジピン酸、ジアミノ酢酸、2-アミノマロン酸、アスパラギン酸、チロシン又はアスパラギンであり、R がエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド
20 結合、O-グリコシド結合又はN-グリコシド結合を介してAの側鎖の反応性置換基に結合していることからなる請求の範囲第 1 項～第 4 項に記載のペプチド断片の製造方法。

6. A がセリン又はスレオニンであり、R がエステル結合を介してAの側鎖の水酸基に結合していることからなる請求の範囲第 5 項に記載のペプチド断片の製造方法。
25

7. ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体、又は前記グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸を含むペプチド断片である請求の範囲第6項に記載のペプチド断片の製造方法。

5 8. (a) 請求の範囲第1項～第7項に記載の方法によって修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を1以上含む保護されているペプチド断片を製造し、前記(a)のペプチド断片とは別個に、(b) 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まず、かつ、アミノ酸又は非アミノ酸の側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト
10 基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる1種以上の、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基が保護されているペプチド断片を製造し、前記(a)及び(b)で製造されたペプチド断片を縮合することを特徴とする修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

15 9. ペプチド断片の縮合が、縮合剤を用いて行われることからなる請求の範囲第8項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

10. 縮合剤が、2-(1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、
20 2-(1-ヒドロベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート(TBTU)、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)、ジフェニルホスホロシアニデート(DEPC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)である
25 請求の範囲第9項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

1 1. 縮合剤が、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 又は 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) であり、前記縮合剤を用いるペプチド断片 (a) と (b) の縮合が、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、1-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) 又は 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-ベンゾトリアジン (HOOBt) の存在下で行われることからなる請求の範囲第 9 項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

1 2. 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を、酵素法又は／及び遺伝子組換え法により製造することからなる請求の範囲第 8 項～第 1 1 項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

1 3. 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を、下記方法；

15 工程 (1)；前記ペプチド断片のアミノ酸配列を有するペプチド（以下、本項において目的ペプチドという。）をコードする塩基配列、又は目的ペプチドに所望によりリンカー配列を介して保護ペプチドが付加されている融合蛋白質をコードする塩基配列のいずれかを有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取

20 する工程；

工程 (2)；工程 (1) において融合蛋白質を採取した場合、得られた融合蛋白質から、保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとを切断分離し、所望により目的ペプチドをさらに精製する工程；

工程 (3)；工程 (1) 又は (2) で得られた目的ペプチドの側鎖における、

25 水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカプト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる 1 種以上の、望ましくな

い副反応を惹起する可能性を有する反応性官能基を保護基により保護する工程；

を含む方法により製造することからなる請求の範囲第12項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

5

14. 工程(2)における保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとの切断分離が、Omp Tプロテアーゼ又はその誘導体及びKex 2プロテアーゼ又はその誘導体を用いて2段階で行われることからなる請求の範囲第13項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

10

15. リンカー配列が、配列番号27に記載の配列である請求の範囲第13項又は第14項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

16. ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ基を含まないペプチド断片であることを特徴とする請求の範囲第12項～第15項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

17. 修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を、pH4～8の溶液中で精製及び保存することを特徴とする請求の範囲第12項～第16項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

18. 保護基がBoc基である請求の範囲第12項～第17項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。

19. 工程(1)；所望のアミノ酸配列を有するペプチド(以下、本項において目的ペプチドという。)をコードする塩基配列又は目的ペプチドに所望

によりリンカー配列を介して保護ペプチドが付加されている融合蛋白質をコードする塩基配列のいずれかを有する発現ベクターにより形質転換された細胞を培養して、当該培養物から目的ペプチド又は前記融合蛋白質を採取する工程；

- 5 工程（２）；工程（１）において融合蛋白質を採取した場合、得られた融合蛋白質から、保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとを切断分離し、所望によりさらに精製する工程；

- 工程（３）；工程（１）又は（２）で得られた目的ペプチドの側鎖における、水酸基、アミノ基、グアニジノ基、イミダゾリル基、インドリル基、メルカ
10 プト基及びカルボキシル基からなる群から選ばれる１種以上の、望ましくない副反応を惹起する可能性を有する反応性置換基を保護基により保護する工程；

工程（４）；工程（３）で得られた保護されている目的ペプチドを、pH 4～8の溶液中で精製及び保存する工程；

- 15 を含む方法により製造することを特徴とする修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法。

- 20 20. 保護基がBoc基である請求の範囲第19項に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法。

21. 工程（２）における保護ペプチド及び所望によりリンカー配列と目的ペプチドとの切断分離が、OmpTプロテアーゼ又はその誘導体及びKex2プロテアーゼ又はその誘導体を用いて２段階で行われることからなる
25 請求の範囲第19項又は第20項に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法。

22. リンカー配列が、配列番号27に記載の配列である請求の範囲第19項～第21項に記載の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ酸を含まない保護されているペプチド断片を製造する方法。

- 5 23. ペプチド断片が、グレリンもしくはその誘導体の中の修飾をうけたアミノ酸又は非アミノ基を含まないペプチド断片であることを特徴とする請求の範囲第19項～第22項に記載の修飾ペプチド又は蛋白質の製造方法。